



Achromobacter xylosoxidans : épidémiologie au centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose de Dijon et réservoir environnemental

Lucie Boyer Amoureux-Boyer

► To cite this version:

Lucie Boyer Amoureux-Boyer. Achromobacter xylosoxidans : épidémiologie au centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose de Dijon et réservoir environnemental. Bactériologie. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS070 . tel-01136694

HAL Id: tel-01136694

<https://theses.hal.science/tel-01136694>

Submitted on 27 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Discipline : Sciences de la Vie
Ecole Doctorale : Environnements – Santé

***ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS* : EPIDEMIOLOGIE AU CENTRE DE
RESSOURCES ET DE COMPETENCES DE LA MUCOVISCIDOSE DE DIJON ET
RESERVOIR ENVIRONNEMENTAL**

Par

Lucie AMOUREUX

Soutenance le 12 décembre 2013

DIRECTEUR DE THESE :

Pr. Catherine NEUWIRTH

MEMBRES DU JURY :

Pr. Hélène MARCHANDIN

Dr. Sylvie NAZARET

Dr. Jocelyne CAILLON

Pr. Frédéric HUET

Rapporteur

Rapporteur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord particulièrement à remercier Madame **Catherine Neuwirth**, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier chef de service de bactériologie du CHU de Dijon qui m'a encadrée tout au long de cette thèse en me faisant profiter de ses grandes compétences scientifiques et cliniques. Merci de vous être toujours rendue incroyablement disponible malgré un emploi du temps surchargé, merci pour votre soutien, votre grande générosité, votre dynamisme et votre optimisme. Merci de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions.

Travailler et apprendre avec vous est un plaisir et une réelle chance.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame **Hélène Marchandin**, Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier en Bactériologie au CHU de Montpellier, de me faire l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Merci pour le temps que vous avez consacré et vos remarques pertinentes.

Je remercie Madame **Sylvie Nazaret**, Chercheur CNRS responsable de l'Equipe « Multirésistance environnementale et efflux bactérien » à Lyon, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Merci de nous faire partager vos compétences en microbiologie environnementale.

Je remercie Madame **Jocelyne Caillon**, Maître de Conférences - Praticien Hospitalier au laboratoire de Bactériologie du CHU de Nantes d'avoir accepté de juger ce travail tout d'abord en tant que membre du Comité de Suivi de thèse puis comme membre du jury.

Je remercie Monsieur le Professeur **Frédéric Huet**, Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier en Pédiatrie, responsable du Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose de Dijon, tout d'abord pour nous avoir permis de collaborer avec le CRCM. Votre aide ainsi que celle de votre équipe nous a été précieuse dans la réalisation de ce travail. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon Comité de suivi de thèse puis de juger ce travail comme membre du jury.

Je tiens à remercier les personnes de **l'équipe d'épidémiologie-recherche** du laboratoire de bactériologie :

- le **Docteur Julien Bador** : pour tes compétences scientifiques, ton aide précieuse, ton amitié, ta bonne humeur et le chocolat...

- **Eliane, Nathalie, Véronique** : pour m'avoir appris votre savoir-faire et m'avoir apporté votre aide dans la réalisation de ce travail. Merci de vos conseils et de votre bonne humeur qui rendent les choses plus faciles.

- le **Docteur Angélique Chapuis** : merci de ton aide et de ton amitié.

- les **internes et étudiants** que j'ai encadrés et qui ont participé d'une manière ou d'une autre à ce travail : Hayat, Cédric, Charlyne, Clémence, Anne-Lise, Guillaume, Leslie, Marceline.

Merci à **l'équipe du secteur « environnement »** du laboratoire :

- le Docteur Nathalie Sixt : merci à toi pour toutes tes remarques pertinentes, tes encouragements, ta gentillesse.

- Ginette, Florence, Edwige pour leur aide pour la filtration des eaux.

Je remercie **toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie** pour leur soutien constant.

- les techniciennes qui se sont adaptées à mes emplois du temps...

- les biologistes qui m'ont toujours rendu service pour l'organisation du travail de routine : Catherine Neuwirth, Julien Bador, Angélique Chapuis, André Péchinot, Jean-Marie Duez et Nathalie Sixt.

- les aides de laboratoire : pour votre disponibilité pour l'autoclavage des milieux et de la verrerie

- Odile Millot : merci de votre efficacité, votre dynamisme, votre gentillesse et votre soutien (pour les commandes express !)

Je remercie également **toute l'équipe du Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose de Dijon**, en particulier Valérie Dechaene, Valérie Louet, Denise Desmaison, Anne Houzel, Annlyse Fanton. Merci de votre disponibilité, de votre collaboration précieuse à ce travail. Je souhaite que ces liens puissent perdurer par la suite.

Merci au Docteur **Alain Hartmann** pour son aide et ses conseils pour la réalisation de prélèvements d'environnement extérieur.

Merci à l'équipe de **l'association "Vaincre la Mucoviscidose"**: Marie Sponga et Lydie Lemonnier qui m'ont permis d'obtenir les données épidémiologiques françaises mentionnées dans cette thèse. Merci de votre disponibilité et de votre aide.

Merci à **l'équipe de virologie** pour le passage des échantillons au séquenceur.

Merci au Docteur **Alexis de Rougemont** pour son aide en informatique et au Docteur **Gaël Belliot** pour ses conseils.

A mes parents : merci d’être toujours disponibles pour des conseils, pour votre aide et votre soutien.

A mes beaux-parents : merci de votre aide.

A mes grands-parents, pour m’avoir toujours encouragée, à “grand-mamie“ Simonne.

A mon frère, mes beaux-frères et belles-sœurs, mes neveux.

A tous mes amis.

A mon mari Sébastien : ce travail n’aurait pas vu le jour sans tes encouragements quotidiens, ton soutien sans faille et ta patience.

A mes petits poussins Arthur, Anaïs et Fanny : merci de m’avoir supportée, attendue et merci d’avoir souvent « fait du travail » avec moi pour m’encourager !

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	15
INTRODUCTION.....	18
I- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	20
A. GENERALITES SUR LA MUCOVISCIDOSE.....	20
a. Epidémiologie	21
b. Diagnostic.....	22
c. Physiopathologie de l'atteinte respiratoire	23
d. Microbiologie	23
i) <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Haemophilus influenzae</i>	24
ii) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
iii) Autres bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNF) émergents	26
iv) Autres agents pathogènes.....	27
v) Mécanismes d'adaptation des bactéries au cours des colonisations chroniques....	30
e. Clinique	33
f. Traitements.....	34
i) Généralités.....	34
ii) Vaccins.....	35
iii) Aérosolthérapie	35
iv) Traitements antibiotiques.....	36
B. GENERALITES SUR <i>A. XYLOSOXIDANS</i>	40
a. Taxonomie : Le genre <i>Achromobacter</i>	40
b. Caractères bactériologiques.....	43
c. Méthodes d'identification et de génotypage	43
i) Techniques biochimiques conventionnelles	43

ii)	Techniques de protéomique (Spectrométrie de masse) :	44
iii)	Techniques d'identification par biologie moléculaire	46
1.	Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (<i>rrs</i>)	46
2.	Techniques de Multilocus Sequence Typing (MLST) ou Multilocus Sequence Analysis (MLSA)	47
3.	Autres techniques d'identification :	48
	Conclusion techniques d'identification	49
iv)	Techniques de génotypage	50
v)	Techniques de restriction enzymatique de l'ADN génomique	50
vi)	Techniques d'amplification génique	52
vii)	Techniques de séquençage de l'ADN génomique (MLST)	54
d.	Sensibilité aux antibiotiques	55
i)	Phénotype de résistance naturelle	55
ii)	Mécanismes de résistance naturelle décrits chez <i>A. xylosoxidans</i>	57
iii)	Mécanismes de résistances acquises décrits chez <i>A. xylosoxidans</i>	59
e.	Pouvoir pathogène et virulence	60
i)	Impact clinique	60
ii)	Virulence	63
f.	Traitements des infections à <i>A. xylosoxidans</i> dans la mucoviscidose	65
C.	EPIDEMIOLOGIE D' <i>A. XYLOSOXIDANS</i> DANS LA MUCOVISCIDOSE	67
a.	Histoire naturelle de la colonisation	67
b.	Prévalence et émergence dans le monde, en France et à Dijon	68
i)	Emergence mondiale	68
ii)	Emergence en France	71
iii)	Emergence à Dijon	72
c.	Epidémiologie de la résistance chez <i>A. xylosoxidans</i> dans la mucoviscidose	73
i)	Résistance aux fluoroquinolones	73
ii)	Résistance aux β -lactamines	74
iii)	Autres antibiotiques	75
d.	Origine de la contamination	76
i)	Transmissions croisées chez les patients atteints de mucoviscidose	76
ii)	Sources environnementales	77

II-OBJECTIFS DU TRAVAIL	82
III-MATERIEL ET METHODES.....	85
A. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES.....	85
a. Souches bactériennes	85
i) Souches de référence	85
ii) Collection de souches cliniques du laboratoire.....	86
b. Milieux de cultures usuels et conditions de culture	87
c. Identification des souches	87
d. Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	87
e. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) :	89
f. Prise en charge d'une expectoration d'un patient atteint de mucoviscidose au laboratoire en routine :	89
B. TECHNIQUES D'AMPLIFICATION GENIQUE ET SEQUENÇAGE	90
a. Amplification génique par PCR	90
b. Séquençage double brin des produits de PCR.....	91
c. Analyse des séquences	91
C. TECHNIQUES DE GENOYPAGE	92
a. Electrophorèse en champ pulsé (ECP)	92
b. Rep-PCR : technologie DiversiLab®	93
IV-PREMIERE ETUDE :	
A. <i>XYLOSOXIDANS</i> : EPIDEMIOLOGIE AU CENTRE DE RESSOURCES ET DE COMPETENCES DE LA MUCOVISCIDOSE DE DIJON	96
A. PRESENTATION DE L'ETUDE	96
B. RESULTATS- DISCUSSION	97
a. Prévalence chez les patients et histoire de la colonisation	97

b. Génotypage par ECP	99
c. Résistance aux antibiotiques	101
d. Séquençage de l'oxacillinase constitutive	103
C. Texte de l'article.....	105
 V-DEUXIEME ETUDE :	114
RECHERCHE DE RESERVOIRS ENVIRONNEMENTAUX D' <i>A. XYLOSOXIDANS</i>	114
 A. PRESENTATION DE L'ETUDE	114
 B. TECHNIQUES SPECIFIQUES A CETTE ETUDE	110
a. Mise au point d'un milieu de culture pour la recherche de souches environnementales d' <i>A. xylosoxidans</i>	115
i) Sélection par les antibiotiques	116
ii) Sélection par le xylose	116
iii) Ajout d'autres antimicrobiens	113
b. Réalisation et prise en charge des prélèvements environnementaux	119
i) Réalisation des prélèvements	119
ii) Mise en culture des prélèvements	120
iii) Identification et caractérisation des souches	120
 C. RESULTATS-DISCUSSION	121
a. Protocole de détection d' <i>A. xylosoxidans</i> dans les prélèvements.....	121
b. Détection de souches environnementales.....	123
c. Génotypage des souches.....	125
d. Sensibilité aux antibiotiques.....	126
e. Séquençage de l'oxacillinase constitutive	127
f. Conclusion.....	128
 D. TEXTE DE L'ARTICLE	129

VI-DISCUSSION.....	140
VII-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	147
IX-BIBLIOGRAPHIE.....	151
X-ANNEXES	169

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
<i>A. ruhlandii</i>	<i>Achromobacter ruhlandii</i>
AMC	Amoxicilline + acide clavulanique
AMX	Amoxicilline
AN	Amikacine
ARN	Acide ribonucléique
ARNr16S	Sous-unité 16S de l'ARN ribosomal
ATM	Aztréonam
BCC	<i>Burkholderia cepacia</i> complex
BCC-ATM-VA	Bouillon Coeur- Cerveille additionné d'aztréonam et de vancomycine
BGN	Bacille à Gram négatif
BGNF	Bacille à Gram négatif non fermentaire
BHI ou BCC	Brain Heart Infusion ou Bouillon Coeur- Cerveille
BLSE	β -lactamase à spectre élargi
C1G, C2G, C3G	Céphalosporine de première, deuxième, ou troisième génération
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CAZ	Ceftazidime
CF	Céfalotine
CIP	Ciprofloxacine
CIP (souche)	Collection de l'Institut Pasteur
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRCM	Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose
CS	Colistine
CTX	Céfotaxime
ddNTP	Didésoxyribonucléotide triphosphate
DES	Danish Epidemic Strain (souche épidémique danoise)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DO	Doxycycline
DOR	Doripénème

ECBC	Examen cyto-bactériologique des crachats
ECFSPR	European Cystic Fibrosis Society Patient Registry
ECP	Electrophorèse en Champ Pulsé
EDTA	Ethylène-diamine-tétra-acétate
EPPI	Eau pour préparations injectables
FEP	Céfépime
FEV₁	Forced Expiratory Volume in 1 second (Volume expiratoire forcé en 1 seconde)
FOS	Fosfomycine
FOX	Céfoxitine
GM	Gentamicine
HAS	Haute Autorité de Santé
IMC	Indice de masse corporelle
IPM	Imipénème
K	Kanamycine
Kb	Kilobase
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight
MCX	MacConkey xylose
MCXVAA	MacConkey xylose-vancomycine-aztréonam-amphotéricine B
MEM	Méropénème
MH	Mueller-Hinton
NA	Acide nalidixique
OFX	Ofloxacin
ONM	Observatoire National de la Mucoviscidose
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIP	Pipéracilline
PLP	Protéine Liant la pénicilline
Qsp	Quantité suffisante pour
RFM	Registre Français de la Mucoviscidose
<i>S. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SARM=MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SDS	Sodium dodécylsulfate

SSS	Sulfamides
SXT	Triméthoprime-sulfaméthoxazole
TCC	Ticarcilline + acide clavulanique
TIC	Ticarcilline
TM	Tobramycine
TZP	Pipéracilline + tazobactam
US CFF	United States Cystic Fibrosis Foundation

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence de la mucoviscidose par département .	21
Figure 2 : Evolution de l'espérance de vie et de la médiane de survie en France entre 1994 et 2005.	22
Figure 3 : Bactéries cliniquement importantes en France .	20
Figure 4 : Bactéries cliniquement importantes aux Etats-Unis .	25
Figure 5 : Répartition des germes en 2001 et en 2011	26
Figure 6 : Représentation de la formation d'un biofilm <i>in vivo</i> .	30
Figure 7 : Position taxonomique de l'espèce <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	40
Figure 8 : Exemple d'antibiogramme standard en milieu gélosé d'une souche d' <i>A. xylosoxidans</i> .	56
Figure 9 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif.	57
Figure 10 : Antibiotiques recommandés pour les traitements contre <i>S. maltophilia</i> et <i>A. xylosoxidans</i> chez les patients atteints de mucoviscidose.	65
Figure 11 : Evolution des prévalences d' <i>A. xylosoxidans</i> au CRCM de Dijon et en France entre 1999 et 2011.	72
Figure 12 : Schéma explicatif de la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF.	88
Figure 13 : Culture d'une souche d' <i>A. xylosoxidans</i> sur gélose MCX	117
Figure 14 : Culture d'une souche de <i>S. maltophilia</i> sur gélose MCX.	117
Figure 15 : Sites des différents prélèvements réalisés dans la nature en Saône et Loire et en Côte d'Or.	119
Figure 16 : Protocole de détection d' <i>A. xylosoxidans</i> dans les prélèvements.	121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques de la mortalité : Périodes 1999-2001 à 2003-2005.	21
Tableau 2 : Nombre de patients recensés en 2008 et en 2009 dans les différents pays faisant partie du registre européen.	69
Tableau 3 : Prévalences de patients colonisés par <i>A. xylosoxidans</i> selon les inter-régions en 2011.	71
Tableau 4 : Liste des souches environnementales présentes dans les banques de données identifiées par les techniques de MLSA (Ridderberg <i>et al.</i> 2012) ou MLST (Spilker <i>et al.</i> 2012) : résultat de l'identification et source.	79
Tableau 5 : Liste des souches de référence d' <i>Achromobacter</i> utilisées dans ce travail.	86
Tableau 6 : Liste des amorces de réactions de PCR ou séquençage utilisées dans ce travail. .	90
Tableau 7 : Caractéristiques des 21 patients et des isolats.	97
Tableau 8 : Comparaison des techniques ECP et Diversilab [®] pour le génotypage de souches isolées chez 19 patients.	100
Tableau 9 : CMI des carbapénèmes pour les souches de sensibilité diminuée isolées chez 6 patients en 2010.	102
Tableau 10 : Caractéristiques des souches des patients P22 à P31 : génotypage et résistance aux antibiotiques.	104
Tableau 11 : Nombre et types de prélèvements hospitaliers et domestiques.	124
Tableau 12 : Prélèvements positifs dans la nature : caractéristiques des souches	124
Tableau 13 : Origine des souches cliniques de même pulsotype que des souches environnementales.	104
Tableau 14 : Nombre de souches catégorisées intermédiaires ou résistantes parmi les souches d'environnements hospitalier, domestique, ou extérieur.	127

LISTE DES DOCUMENTS EN ANNEXES

Annexe 1 : Souches types décrites dans le genre <i>Achromobacter</i> . Origine et dénomination dans les différentes collections.....	169
Annexe 2 : Antibiotiques les plus cités dans ce travail	171
Annexe 3 : Liens internet vers les rapports des différents registres de la mucoviscidose mentionnés dans ce travail :	172
Annexe 4 Aligement des séquences protéiques des différents variants de l'enzyme OXA-114	173
Annexe 5 : Aligement des séquences protéiques des différents variants de l'enzyme OXA-243.	176
Annexe 6 : Sites et nombre de prélèvements d'environnement extérieur.....	177
Annexe 7 : Origine des souches des patients non atteints de mucoviscidose	178
Annexe 8 : Origines et caractéristiques des 50 souches environnementales (deuxième étude).	179
Annexe 9 : Communication affichée : Detection of <i>Achromobacter xylosoxidans</i> in hospital environment.....	183
Annexe 10 : Résumé des articles décrivant les systèmes d'efflux AxyABM et AxyXY-OprZ	185

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente dans les populations caucasiennes. La production de sécrétions muqueuses anormalement visqueuses est à l'origine de troubles digestifs et respiratoires. L'atteinte respiratoire conditionne le pronostic de la maladie, puisqu'elle est responsable de 80% des décès dans la mucoviscidose. Au cours de l'évolution de la maladie, différents agents pathogènes colonisent l'arbre respiratoire, et sont à l'origine de surinfections, les principaux étant *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Depuis une dizaine d'années, d'autres agents pathogènes émergent également dans la mucoviscidose, avec parmi eux *Stenotrophomonas maltophilia*, les bactéries du complexe *Burkholderia cepacia* ainsi qu'*Achromobacter xylosoxidans*.

Le pouvoir pathogène d'*A. xylosoxidans* est encore controversé, mais une étude récente a démontré que le niveau d'inflammation retrouvé lors des colonisations chroniques était comparable à celui retrouvé avec *P. aeruginosa*.

Les causes de l'émergence d'*A. xylosoxidans* sont encore inconnues. Cette bactérie est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques, ceci pouvant ainsi compromettre le traitement des colonisations par *P. aeruginosa*, fréquemment associé dans cette maladie.

Au CRCM de Dijon la prévalence de patients colonisés est élevée depuis plusieurs années. Le mode de contamination des patients ainsi que le réservoir naturel de cette espèce bactérienne ne sont pas connus à l'heure actuelle. Afin d'en comprendre les raisons, il était nécessaire dans un premier temps de décrire la situation épidémiologique au CRCM de Dijon pour pouvoir détecter une éventuelle source commune de contamination ou des transmissions croisées entre les patients. Dans un second temps, nous avons recherché des sources de contamination environnementales de façon à mieux comprendre les facteurs de risque de colonisation des patients.

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

I- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

A. GENERALITES SUR LA MUCOVISCIDOSE

La mucoviscidose est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive. C'est la plus fréquente des maladies génétiques potentiellement graves dès l'enfance dans les populations caucasiennes (O'Sullivan and Freedman 2009), et notamment en France¹. Il s'agit d'une exocrinopathie généralisée, frappant les glandes séreuses et les glandes à sécrétion muqueuse. L'atteinte des glandes à mucus semble liée à la production de sécrétions visqueuses (d'où le nom donné à la maladie, « mucus visqueux »). Sont touchés principalement : l'appareil respiratoire, le tube digestif et ses annexes (pancréas, foie et voies biliaires), mais également les glandes sudoripares et le tractus génital. Ceci entraîne une insuffisance respiratoire chronique, grave et évolutive, et des troubles digestifs permanents.

Cette maladie, longtemps connue sous le nom de maladie des enfants au « baiser salé » est décrite en 1936 par Fanconi qui identifie l'association "fibrose kystique congénitale du pancréas et broncheectasies" et, en 1938, Andersen donne la description anatomo-pathologique complète de la mucoviscidose. En 1953, Di Sant'Agnese met en évidence un excès de chlorure de sodium dans la sueur des enfants atteints de mucoviscidose. Cette découverte conduira à la mise au point du "test de la sueur", seul test de diagnostic positif de la maladie actuellement disponible.

Le gène responsable de la maladie est localisé en 1989 par l'équipe du Professeur Tsui (Kerem *et al.* 1989).

Il est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31) et code pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), protéine de 1480 acides aminés intervenant dans le transport des ions chlorures au niveau de la membrane cellulaire (Gilligan 1991; Reisin *et al.* 1994).

¹ D'après la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie (CNAM) : "Prise en charge de la mucoviscidose en Affection de Longue Durée", *points de repère*, numéro 7, mars 2007.

http://www.ameli.fr/fileadmin/user_upload/documents/Points_de_repere_n_7.pdf

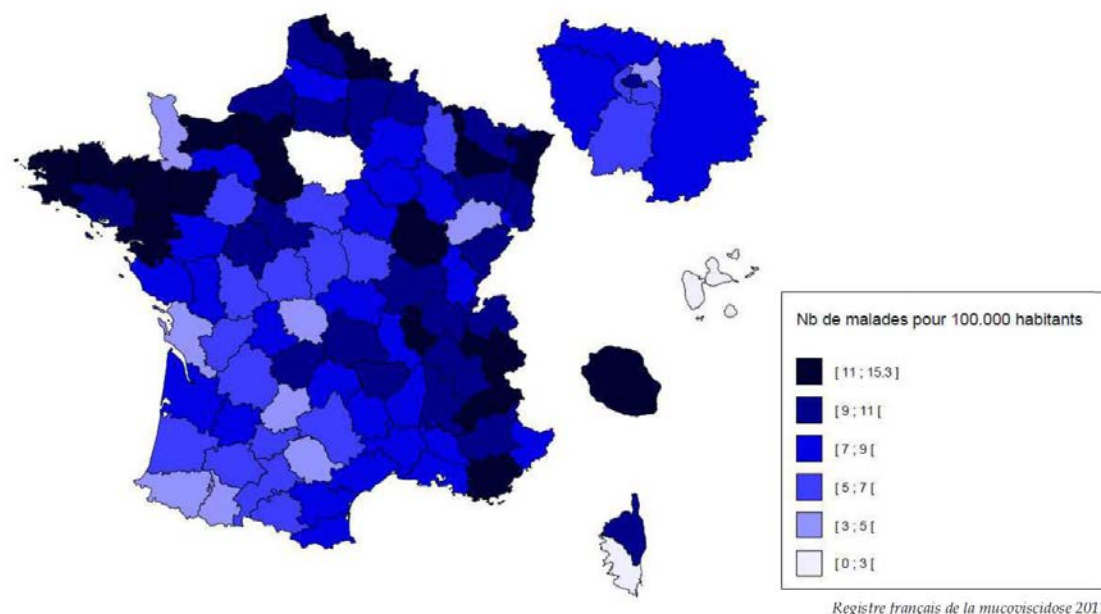


Figure 1 : Prévalence de la mucoviscidose par département (nombre de patients pour 100 000 habitants) "Registre Français de la Mucoviscidose - Bilan des données 2011 de l'ONM" Vaincre la Mucoviscidose et Ined. Paris, 2013".

PÉRIODES	INDICATEURS DE LA MORTALITÉ			
	Taux brut de mortalité (en ‰)	Âge moyen des décédés (en années)	Espérance de vie à la naissance (en années)	Vie médiane (en années)
1999-2001	14,7	23,8	39,0	35,7
2000-2002	15,8	23,8	38,0	35,6
2001-2003	15,8	24,0	39,1	36,4
2002-2004	14,6	23,1	42,4	38,0
2003-2005	11,9	24,0	47,0	46,7

Tableau 1 : Caractéristiques de la mortalité : Périodes 1999-2001 à 2003-2005.

"Registre Français de la Mucoviscidose - Bilan des données 2005 de l'ONM" Vaincre la Mucoviscidose et Ined. Paris, 2007

Les enfants atteints sont porteurs de 2 gènes mutés. On estime qu'environ 1 sujet sur 25 est porteur asymptomatique d'une mutation du gène. Plus de 1900 mutations ont été identifiées à ce jour (Cystic Fibrosis Mutation Database, Statistics) <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>, la plus fréquente conduisant à la délétion de la phénylalanine en position 508, F508del, rencontrée chez 2/3 des malades en Europe et en Amérique du Nord (O'Sullivan and Freedman 2009). L'expression clinique de ces mutations est variable pouvant aller de formes asymptomatiques à des formes sévères rapidement évolutives. A l'heure actuelle il n'est pas possible d'associer une mutation à une forme clinique mais les formes cliniques les plus sévères seraient souvent retrouvées chez les patients porteurs de la mutation F508del à l'état homozygote (Ferec *et al.* 2012).

a. Épidémiologie

La maladie est présente dans la plupart des pays et particulièrement en Europe, aux Etats-Unis et au Canada, ainsi qu'en Australie et en Nouvelle-Zélande. Cette maladie est rare en Afrique et en Asie (O'Sullivan and Freedman 2009).

En France, on compte environ 6500 malades². L'association de malades aujourd'hui nommée « Vaincre la Mucoviscidose » a mis en place en 1992 l'Observatoire National de la Mucoviscidose (ONM) avec l'objectif de recenser les malades atteints de cette maladie en France, et d'améliorer la connaissance de leurs caractéristiques médicales, génétiques, épidémiologiques et sociodémographiques. Cet observatoire, devenu en 2007 le Registre Français de la Mucoviscidose (RFM), procède à un recueil annuel des données à partir des centres hospitaliers spécialisés dans la prise en charge de la mucoviscidose.

Environ 200 enfants naissent chaque année avec la mucoviscidose ce qui représente environ un nouveau-né sur 4136 avec de grandes variations régionales, la Bretagne restant la région la plus touchée (Munck *et al.* 2008). D'après le bilan des données 2011 du RFM², la Côte d'Or fait partie des départements où la prévalence est la plus élevée : entre 11 et 15 malades pour 100 000 habitants (Figure 1). La Saône et Loire présente également une prévalence élevée (entre 9 et 11/100 000).

² "Registre Français de la Mucoviscidose - Bilan des données 2011 de l'ONM" Vaincre la Mucoviscidose et Ined. Paris, 2013. http://www.vaincrelamuco.org/e_upload/div/registre_francais_mucoviscidose_2011_15.03.13.pdf

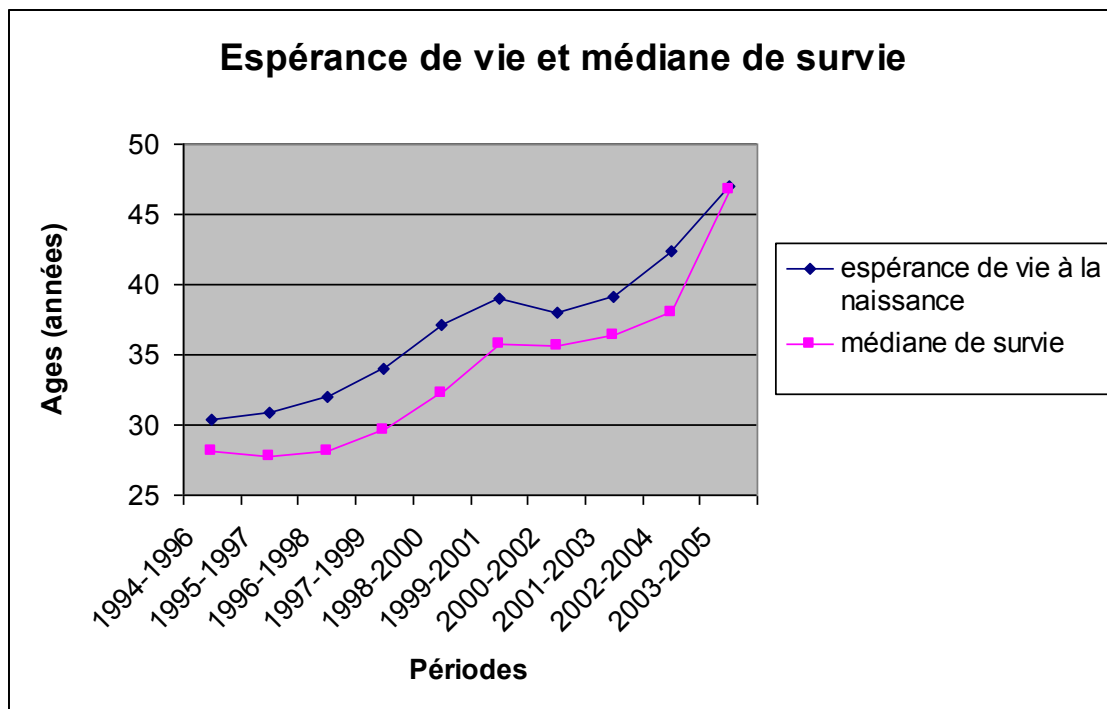


Figure 2 : Evolution de l'espérance de vie et de la médiane de survie en France entre 1994 et 2005. D'après les données de l'ONM. Vaincre la Mucoviscidose et Ined. Paris

L'âge moyen des patients au moment du décès était de 26 ans en France 2011. Cependant, grâce à l'amélioration de la prise en charge des malades et notamment à l'utilisation de l'antibiothérapie, l'espérance de vie à la naissance et la vie médiane sont en constante augmentation (Buzzetti *et al.* 2009). Cette tendance est rapportée aux Etats-Unis, au Canada, en Europe (Buzzetti *et al.* 2009). En France notamment, l'espérance de vie à la naissance est passée de 39 ans en 1999-2001 à 47 ans en 2003-2005 et la médiane de survie de 35,7 à 46,7 ans. Tableau 1, Figure 2.

b. Diagnostic

Avant la mise en place d'un dépistage néonatal systématique, le diagnostic était évoqué en cas de signes d'appel cliniques digestifs ou respiratoires (diarrhée graisseuse, encombrement des bronches, infections récidivantes des voies respiratoires). Le test de la sueur, consistant à doser les ions chlorures dans la sueur, était alors réalisé. La présence d'un taux élevé confirmait le diagnostic, et celui-ci était complété par l'étude du gène *CFTR* à la recherche des mutations en cause (RFM 2011).

Depuis 2002, un dépistage néonatal systématique a été mis en place en France. Il repose sur le dosage de la trypsine immuno-réactive, protéine dont la sécrétion est augmentée en cas d'anomalie pancréatique pendant la vie fœtale et les premiers mois de la vie. Ce test n'est pas spécifique mais il permet de dépister plus de 95% des malades. (Munck *et al.* 2008). Une recherche de mutations du gène codant pour la protéine CFTR est donc réalisée en cas de positivité du test. Les nouveau-nés présentant une ou plusieurs mutations du gène sont ensuite pris en charge dans un CRCM (Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose). La confirmation du diagnostic nécessite alors l'évaluation clinique et la réalisation du test de la sueur. La mise en place de ce dépistage systématique a montré de manière certaine un bénéfice à moyen terme sur le plan nutritionnel. Un bénéfice à long terme sur le plan respiratoire a été également démontré et résulterait d'une meilleure prise en charge nutritionnelle dès le dépistage (O'Sullivan and Freedman 2009). Il est cependant à noter que des études réalisées par Farrell en 1997 et 2003 (Farrell *et al.* 1997; Farrell *et al.* 2003) ont démontré que les enfants diagnostiqués grâce au dépistage néonatal pouvaient être colonisés plus tôt par *P.aeruginosa* que les autres. Les auteurs expliquent que les « petits » dépistés étaient en contact avec d'autres enfants malades plus âgés dans la salle d'attente des

consultations, ceci engendrant des transmissions croisées. La mise en place de mesures d'isolement des patients colonisés par *P. aeruginosa* a permis diminuer ce risque.

Au total, le rapport bénéfice-risque étant important, les Etats-Unis ont décidé de mettre en place le dépistage systématique dans les 50 états en 2010.

c. Physiopathologie de l'atteinte respiratoire

Pour l'épithélium respiratoire, les mutations de la protéine CFTR sont responsables de perturbations des échanges ioniques entraînant une déshydratation du film séro-muqueux et ainsi l'augmentation de la viscosité du mucus, favorisant l'accumulation et la fixation des bactéries aux mucines. De même, les propriétés antibactériennes du mucus sont diminuées. Ces éléments concourent à l'installation précoce d'une infection rapidement chronique, associée à une réaction inflammatoire particulièrement marquée. Cette réponse chronique provoque alors des lésions bronchiques progressives et permanentes. Des bronchectasies et une insuffisance respiratoire sont habituelles quand l'atteinte respiratoire mucoviscidique atteint le stade terminal. L'insuffisance respiratoire est responsable de plus de 80% des décès liés à cette maladie (O'Sullivan and Freedman 2009).

La colonisation bactérienne survient très tôt dans l'histoire naturelle de la maladie (dès la première année de vie) (Hauser *et al.* 2011). En effet cette déficience des défenses locales propre à la mucoviscidose ne permet pas de maintenir la stérilité des voies aériennes inférieures.

d. Microbiologie

Les premiers microorganismes retrouvés au niveau respiratoire sont *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus*. Le plus souvent ils précèdent, de quelques mois à plusieurs années, la colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* qui devient alors l'agent pathogène prédominant. D'autres agents bactériens, viraux et fongiques, sont fréquemment associés à l'évolution de la maladie, les principales bactéries étant *Burkholderia cepacia* complex, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* et les mycobactéries atypiques (O'Sullivan and Freedman 2009; Hauser *et al.* 2011) (Figures 3 et 4)

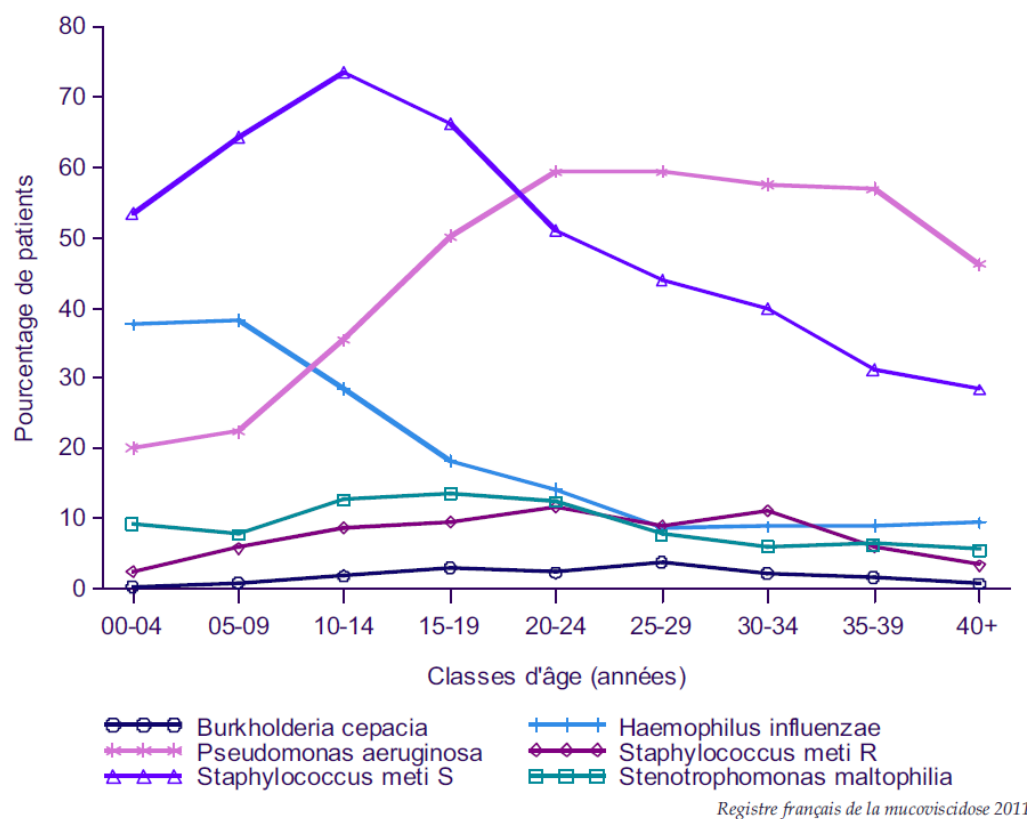


Figure 3 : Bactéries cliniquement importantes en France (en pourcentage selon l'âge)."Registre Français de la Mucoviscidose - Bilan des données 2011 de l'ONM" Vaincre la Mucoviscidose et Ined. Paris, 2013.

i) Staphylococcus aureus et Haemophilus influenzae

Ces deux bactéries appartiennent à la flore commensale du rhinopharynx et sont responsables de la majorité des infections respiratoires au début de l'évolution de la maladie. Avant l'avènement de l'antibiothérapie les infections à *S. aureus* et *H. influenzae* étaient responsables d'une forte mortalité et morbidité dans cette pathologie.

✓ *Staphylococcus aureus*

S. aureus est historiquement la première bactérie à avoir été associée à l'atteinte respiratoire dans la mucoviscidose et était la première cause de mortalité dans les années 1950 avant l'utilisation des antibiotiques. Les thérapies anti-staphylococciques ont considérablement amélioré l'espérance de vie des malades. *P. aeruginosa* est alors devenu le pathogène majeur le plus impliqué dans la morbidité et la mortalité (Hauser *et al.* 2011).

S. aureus reste la bactérie la plus fréquemment isolée dans les premières années de vie. Il s'agit au départ le plus souvent de souches sensibles à la méticilline. Les souches résistantes de type SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline, MRSA) émergent plus tardivement. Ces dernières ont acquis un mécanisme de résistance à toutes les β -lactamines par le biais de l'acquisition du gène *mecA* codant pour la PLP2a. L'activité de cette protéine liant la pénicilline atypique n'est pas affectée par les β -lactamines. Si la sélection de SARM est supérieure chez les enfants ayant reçu le plus de traitements antibiotiques, l'impact clinique de la présence de ces souches n'est pas clairement démontré (Hauser *et al.* 2011). *S. aureus* est capable de coloniser l'arbre respiratoire au long cours. Il est alors parfois observé un phénotype particulier en culture : les variants à petites colonies (SCV) (voir page 31). Les conséquences cliniques de la colonisation par ce type de variants ne sont pas établies à l'heure actuelle.

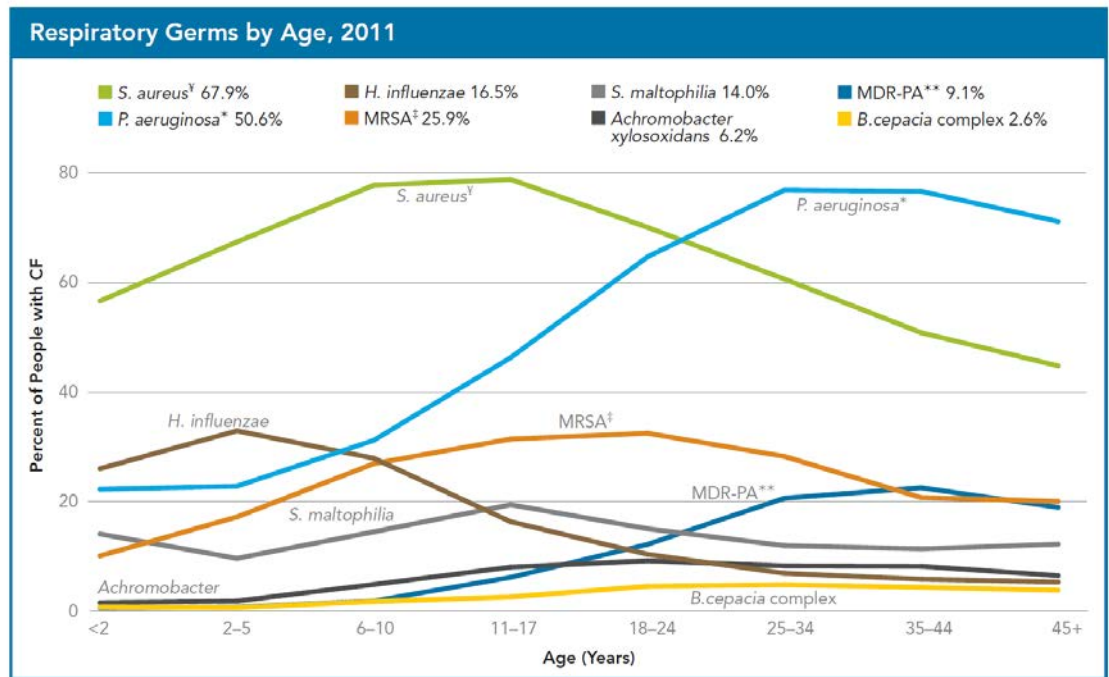


Figure 4 : Bactéries cliniquement importantes aux Etats-Unis (en pourcentage selon l'âge). Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2011 Annual Data Report. Bethesda Maryland, 2012.

Les pourcentages indiqués pour chaque bactérie correspondent à la prevalence moyenne de patients colonisés.

^{**} MDR-PA: Multi-drug resistant *P. aeruginosa* : souches de *P. aeruginosa* présentant des résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques.

^{*}*P. aeruginosa* : inclut les patients porteurs de MDR-PA.

[‡]MRSA : Methicillin Resistant *S. aureus* : souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline

[‡]*S. aureus* inclut les patients porteurs de MRSA

✓ *Haemophilus influenzae*

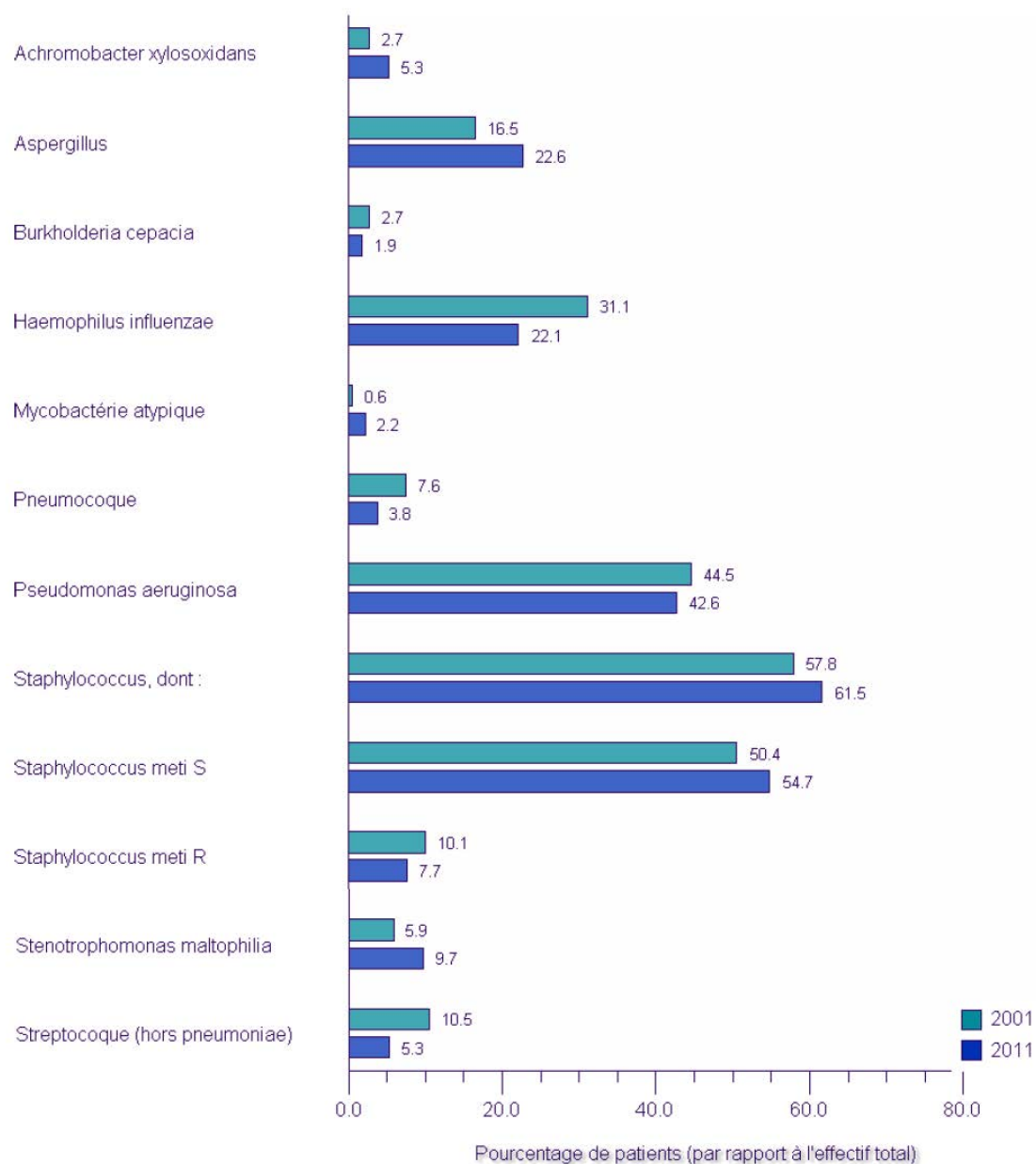
H. influenzae est un bacille à Gram négatif fréquemment retrouvé dans les voies respiratoires des malades, particulièrement dans les premières années de vie. Il s'agit le plus souvent d'*H. influenzae* non typables. La vaccination contre le type b n'est donc pas protectrice. Aujourd'hui l'impact d'une colonisation par cette bactérie sur l'évolution de la fonction respiratoire est controversé. En revanche *H. influenzae* jouerait un rôle dans les exacerbations aiguës de la maladie (Hauser *et al.* 2011). De plus cette bactérie pourrait former un biofilm à la surface des cellules épithéliales pulmonaires comme *P. aeruginosa* (Starner *et al.* 2006).

ii) *Pseudomonas aeruginosa*

Ce bacille à Gram négatif non fermentant est l'agent pathogène entraînant des infections graves le plus fréquemment retrouvé dans la maladie. Cette bactérie est présente dans l'environnement et notamment dans l'eau, mais le mode de contamination des patients n'est encore pas connu en dehors des contaminations croisées (Saiman 2011). L'isolement de *P. aeruginosa* dans les prélèvements est associé à une détérioration de la fonction pulmonaire dans l'histoire de la maladie. Le pourcentage de patients colonisés reste faible au début de cette pathologie, avec des colonisations intermittentes. Au cours de l'évolution, la prévalence de patients colonisés augmente, pouvant atteindre jusqu'à 80 % des adultes (Figure 3). La forte prévalence de cette bactérie chez ce type de malade peut s'expliquer par ses grandes capacités à s'adapter à son environnement, lui permettant de s'installer et de persister de manière durable dans les voies respiratoires sous forme de biofilms (voir page 30). Parmi les différentes formes d'adaptation retrouvées chez *P. aeruginosa* au cours du temps, on retrouve fréquemment l'acquisition d'un phénotype mucoïde associé à une aggravation de la fonction respiratoire et à une augmentation de la mortalité (Henry *et al.* 1992; Li *et al.* 2005; Farrell *et al.* 2009).

De plus, la plupart des patients sont colonisés par le même clone toute leur vie et sous la pression des cures successives d'antibiotiques, des mutants résistants sont sélectionnés (Saiman and Siegel 2004).

Le recours à l'antibiothérapie a considérablement amélioré l'espérance de vie des malades, et on assiste ainsi à l'émergence depuis ces deux dernières décennies de pathogènes autres que *P. aeruginosa*.



Registre français de la mucoviscidose 2011

Figure 5 : Répartition des germes en 2001 et en 2011 (en pourcentage selon l'année).
 "Registre Français de la Mucoviscidose - Bilan des données 2011 de l'ONM" Vaincre la Mucoviscidose et Ined. Paris, 2013

iii) Autres bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNF) émergents

✓ *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia, connu auparavant sous le nom de *Xanthomonas maltophilia*, est un bacille à Gram négatif retrouvé dans l'environnement, en particulier les sols (Pinot *et al.* 2011), les milieux humides (rivères, lacs) mais également associé aux plantes (Denton and Kerr 1998).

Il est responsable d'infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés (Looney *et al.* 2009) (bactériémies, pneumonies, méningites, endocardites), mais également chez les patients immunocompétents. Il est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques, notamment aux carbapénèmes et à tous les aminoglycosides. Considéré comme un pathogène émergent chez les patients atteints de mucoviscidose, il est isolé principalement chez les patients les plus âgés et pour lesquels l'atteinte respiratoire est plus importante (Goss *et al.* 2002). Cette bactérie a été isolée chez 9,7% des patients ayant eu un ECBC (examen cytobactériologique des crachats) en France en 2011 contre 5,9% en 2001. Cette bactérie émerge également aux Etats-Unis et en Europe (Waters 2012). Le registre de la Cystic Fibrosis Foundation rapporte une prévalence en 2011 de 14%. La pathogénicité de ce germe reste encore controversée dans la mucoviscidose, certains auteurs ayant des arguments en sa faveur, (Waters *et al.* 2011) et d'autres à l'encontre (Goss *et al.* 2002). Sa résistance naturelle aux carbapénèmes peut poser problème dans le traitement des co-infections avec *P. aeruginosa*.

✓ *Burkholderia cepacia complex (BCC)*

Ce complexe regroupe au minimum 9 espèces bactériennes proches, *B. cenocepacia* et *B. multivorans* étant les plus fréquemment isolées chez les malades. Ce sont des bactéries de l'environnement (sol et plantes) pouvant coloniser les voies respiratoires des patients voire être responsables d'infections mettant en jeu leur pronostic vital (Mahenthiralingam *et al.* 2005).

Dès les années 1980, ces bactéries ont été reconnues comme agents pathogènes sévères dans la mucoviscidose. Les craintes suscitées par cette infection sont liées à la possibilité de la

survenue d'une forme aigue grave, appelée le « syndrome cepacia ». Dans cette forme, l'infection se complique d'une bactériémie avec fièvre et instabilité hémodynamique, ainsi que d'une nécrose pulmonaire qui peut être fatale en quelques jours à quelques mois malgré une antibiothérapie agressive. De plus, cet agent pathogène est facilement transmissible entre patients, pouvant engendrer des épidémies chez les malades. Certains centres rapportaient des taux d'infection très élevés dans les années 1980. Cependant la mise en place de mesures d'hygiène stringentes a permis de diminuer la prévalence des patients infectés (Hauser *et al.* 2011). Aujourd'hui elle est faible et stabilisée (2,7 % en 2001 en France contre 1,9 % en 2011) (Figure 5).

Les infections à *BCC* peuvent également se présenter sous forme chronique, plus classique dans la mucoviscidose, avec la capacité de former des biofilms comme *P. aeruginosa* (Waters 2012). Ceci conduit à terme à une détérioration de la fonction pulmonaire raccourcissant la durée de vie des malades (Saiman and Siegel 2004).

✓ *A. xylosoxidans* (voir I-B)

A. xylosoxidans est également classé parmi les pathogènes émergents dans la mucoviscidose.

iv) Autres agents pathogènes

✓ *Virus*

Comme la population générale, les patients atteints de mucoviscidose sont sensibles aux infections virales respiratoires par le VRS (virus respiratoire syncytial), le virus de la grippe, les adénovirus, ou les rhinovirus. Les complications de ces infections sont cependant plus fréquentes chez ce type de malade (hospitalisations, dégradation de la fonction pulmonaire, prédisposition aux infections bactériennes...). A l'heure actuelle, il reste difficile de déterminer si la dégradation de la fonction pulmonaire est directement liée à l'action des virus, ou si l'action des virus favorise l'installation d'autres agents pathogènes délétères comme *P. aeruginosa*.

✓ Eléments fongiques

L'utilisation de l'antibiothérapie entraîne une colonisation pulmonaire fréquente par les levures du genre *Candida*, ainsi que par des moisissures, notamment du genre *Aspergillus*. Les levures du genre *Candida* sont le plus souvent considérées comme des agents commensaux. En revanche *A. fumigatus* peut être responsable d'aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques, ou plus rarement d'aspergillomes chez les patients atteints de mucoviscidose, particulièrement en cas de colonisations chroniques. En dehors de ces situations, le rôle d'*Aspergillus* dans la dégradation de la fonction respiratoire reste encore controversé (Hauser *et al.* 2011).

✓ Mycobactéries atypiques

Les patients atteints de mucoviscidose ont un risque supérieur aux autres d'être colonisés ou infectés par des mycobactéries atypiques voire plus rarement par *M. tuberculosis*. Les mycobactéries atypiques sont présentes dans l'environnement (sols, eaux, plantes, animaux) (Waters 2012) et se comportent comme des agents pathogènes opportunistes chez les patients immunodéprimés mais également les immunocompétents. Elles sont de plus en plus retrouvées chez les patients à un stade avancé de la maladie, les principales étant *Mycobacterium avium* complex et *Mycobacterium abscessus*. L'impact clinique n'est pas encore clairement démontré. En effet, elles peuvent être isolées de manière transitoire comme contaminants dans l'arbre respiratoire. Une étude française a montré que 6% des patients étaient colonisés (Roux *et al.* 2009). Les données 2011 du registre français de la mucoviscidose rapportent un taux de patients de 2,2% comparativement à 0,6% en 2001. Cependant la recherche des mycobactéries atypiques n'est pas réalisée en systématique chez les patients atteints de mucoviscidose en particulier en raison de la difficulté de mise en œuvre des techniques de laboratoire et d'interprétation des résultats. Les données actuelles sous-estiment donc probablement la prévalence des infections.

✓ Autres bactéries

- anaérobies

Les bactéries anaérobies, fréquemment isolées dans les voies respiratoires, pourraient également jouer un rôle dans l'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose mais l'implication de ces espèces reste encore à démontrer (Doring *et al.* 2012).

- Streptocoques

Les bactéries du genre *Streptococcus* constituent une part importante de la flore commensale oropharyngée. Cependant dans quelques cas, l'isolement d'une seule espèce en grande quantité dans les prélèvements respiratoires a été associé à des phases d'exacerbations avec notamment *S. milleri* (Grinwis *et al.* 2010) (ou *S. agalactiae* (Eickel *et al.* 2009)). Les numérations de bactéries dans les expectorations sont donc fondamentales pour faciliter l'interprétation des résultats de culture. (Rabin and Surette 2012)

- *Pandoraea apista*, *Inquilinus limosus*, *Ralstonia* spp.

Ces bacilles à Gram négatif peu connus des bactériologistes posent des difficultés d'identification au laboratoire avec des problèmes de confusions avec d'autres bacilles à Gram négatif non fermentaires (Hogardt *et al.* 2009; Kidd *et al.* 2009; Fernandez-Olmos *et al.* 2012). Néanmoins l'utilisation de nouvelles techniques d'identification a permis de montrer qu'elles pouvaient être isolées chez des patients atteints de mucoviscidose et même capables d'engendrer des colonisations chroniques (Coenye *et al.* 2002; Chiron *et al.* 2005; Atkinson *et al.* 2006; Salvador-Garcia *et al.* 2013).

De plus *P. apista* a été incriminée dans des transmissions croisées entre patients (Jorgensen *et al.* 2003), et *I. limosus* est capable de former des colonies de phénotype mucoïde (Hayes *et al.* 2009). Peu de données sont actuellement disponibles concernant le pouvoir pathogène et la prévalence de ces bactéries chez les malades.

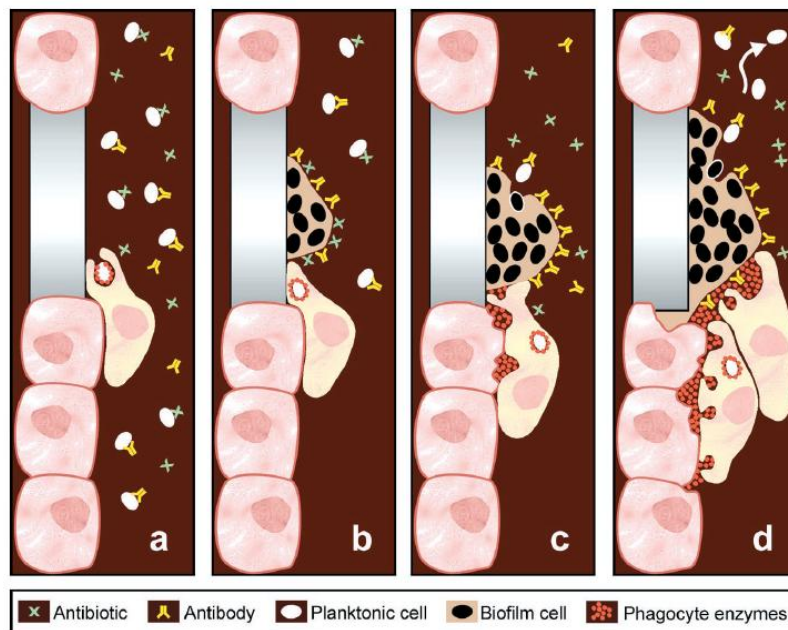


Figure 6 : Représentation de la formation d'un biofilm *in vivo*. (Costerton *et al.* 1999)

- a.** les bactéries à l'état planctonique peuvent être éliminées par les anticorps, les cellules phagocytaires, et sont sensibles aux antibiotiques.
- b.** les cellules bactériennes adhérentes forment un biofilm, préférentiellement sur une surface inerte, et cette communauté bactérienne sessile est résistante aux anticorps, aux phagocytes et aux antibiotiques.
- c.** les phagocytes sont attirés vers le biofilm. Ils ne peuvent réaliser de phagocytose mais relarguent des enzymes phagocytaires.
- d.** les enzymes phagocytaires attaquent le biofilm, et quelques cellules bactériennes planctoniques sont relarguées et capables de disséminer vers les tissus environnants.

v) Mécanismes d'adaptation des bactéries au cours des colonisations chroniques

Dans la mucoviscidose les bactéries peuvent persister pendant plusieurs années dans l'arbre respiratoire. Au cours de ces colonisations chroniques, on observe que les bactéries développent des mécanismes d'adaptation à ce nouvel environnement.

✓ Formation de biofilms

Pour survivre dans des conditions de stress, certaines bactéries sont capables de s'adapter en formant une communauté bactérienne adhérent à une surface, appelée biofilm (Costerton *et al.* 1999). Ce biofilm est un ensemble de bactéries adhérent entre elles, et sécrétant une matrice adhésive et protectrice (contenant des protéines, de l'ADN et des polysaccharides). Les bactéries sont alors à l'état « sessile », contrairement à l'état « planctonique » qui correspond aux bactéries libres et en mouvement dans leur environnement. Ce mode de vie est associé aux colonisations persistantes non seulement chez l'homme dans le cadre des infections chroniques (mucoviscidose, endocardites, ostéites, infections sur matériel...) mais également dans les environnements humides (rivières, canalisations...). Les biofilms peuvent être polymicrobiens.

Chez l'homme il a été montré que les bactéries des biofilms résistent davantage aux agressions extérieures : défenses immunitaires et antibiotiques par exemple (Costerton *et al.* 1999; Hoiby *et al.* 2010; Alhede *et al.* 2011) (Figure 6).

Dans le cadre de la mucoviscidose, la formation de biofilms dans les colonisations chroniques est bien connue pour *P. aeruginosa* mais également pour *S. aureus*, *H. influenzae*, *BCC* et *S. maltophilia*.

✓ **Small colony variants (SCV)**

L'une des adaptations les plus couramment décrites chez *S. aureus* est la capacité à former en culture des variants à petites colonies ou « Small-Colony Variants » (SCV). Ces variants ont un métabolisme particulier avec une vitesse de croissance plus lente, ce qui aboutit à la formation de petites colonies, souvent non pigmentées et non hémolytiques. Ces variants ont ainsi la capacité de persister plus longtemps dans un environnement hostile : survie intracellulaire, résistance plus importante aux antibiotiques ou aux défenses immunitaires de l'hôte. La présence de ces souches chez les patients a été associée à une dégradation plus importante de la fonction respiratoire (Besier *et al.* 2007). Cependant il est possible que la colonisation des patients par ce type de variant ne soit qu'un marqueur d'un état plus avancé dans la maladie (Hauser *et al.* 2011).

✓ **Phénotype mucoïde**

Le phénotype mucoïde observé en culture correspond à la surproduction d'alginate (capsule) par les bactéries due une mutation dans le gène *mucA*. Ce phénotype est fréquemment observé chez les patients atteints de mucoviscidose colonisés de façon chronique par *P. aeruginosa*. Cette capsule permet à la bactérie de mieux résister aux agressions extérieures (comme les antibiotiques ou le système immunitaire) et favorise la formation du biofilm (Hauser *et al.* 2011).

Chez *P. aeruginosa*, il a été montré que la colonisation des patients par des souches mucoïdes était associée à une aggravation de la fonction respiratoire et à une augmentation de la mortalité par rapport aux patients colonisés par des souches non mucoïdes (Henry *et al.* 1992; Li *et al.* 2005; Farrell *et al.* 2009).

Des souches mucoïdes peuvent également être retrouvées chez d'autres espèces bactériennes dans le cadre de la mucoviscidose : *BCC* (Silva *et al.* 2011), *S. maltophilia* (Cescutti *et al.* 2011) ou *Inquilinus limosus* (Hayes *et al.* 2009).

✓ **Phénotype hypermutable**

Ce phénotype désigne des bactéries qui acquièrent des mutations spontanées à une fréquence anormalement élevée (jusqu'à 1000 fois plus importante). Ceci est dû à une anomalie dans un ou plusieurs gènes (*mutS*, *mutL*, *uvrD*...) codant pour des protéines réparant les erreurs de réplication de l'ADN (Oliver *et al.* 2002). Ceci leur procurerait un avantage adaptatif au cours des colonisations chroniques (persistance dans l'arbre respiratoire, acquisition de résistances aux antibiotiques). Ce phénotype est fréquemment retrouvé chez *S. aureus*, *H. influenzae* et chez *P. aeruginosa* (Oliver *et al.* 2000) notamment chez des souches résistantes aux antibiotiques (Chopra *et al.* 2003), ou présentant d'autres formes d'adaptation (SCV, phénotype mucoïde...).

✓ **Croissance en anaérobiose**

Chez les patients atteints de mucoviscidose, la présence importante de mucus dans les voies respiratoires prive les bactéries d'oxygène. En effet, le taux d'oxygène dans le mucus est très faible, voire nul, ceci étant en partie dû à son utilisation par les polynucléaires neutrophiles sollicités (Worlitzsch *et al.* 2002; Kolpen *et al.* 2009). Les bactéries capables de croissance en anaérobiose peuvent s'adapter dans de telles conditions et s'en retrouvent donc favorisées. Par exemple *P. aeruginosa*, normalement aérobie strict, est capable de s'adapter en l'absence d'oxygène par l'utilisation des nitrates. Grâce à des réactions de dénitrification par des nitrate-réductases, l'azote peut être utilisé comme accepteur final d'électron de la chaîne respiratoire à la place de l'oxygène (McCaughey *et al.* 2013). Ceci procure un avantage adaptatif supplémentaire.

e. Clinique

Sur le plan clinique, l'anomalie entraîne principalement des troubles digestifs, une atteinte des voies respiratoires ainsi qu'une infertilité chez l'homme. S'il existe une grande diversité d'expressions cliniques, tant pour l'âge d'apparition des premiers symptômes que pour la sévérité de l'évolution, l'atteinte respiratoire est la cause majeure de mortalité et morbidité. L'insuffisance respiratoire est la première cause de décès dans la mucoviscidose (Courtney *et al.* 2007). Cliniquement il existe une toux chronique avec expectorations purulentes lors des exacerbations, une hypoxie ainsi qu'un syndrome obstructif chronique.

Les exacerbations sont définies par « la survenue d'un épisode aigu de détérioration clinique sur un état stable avec altération de l'état général (anorexie, asthénie, diminution de l'activité, stagnation pondérale ou amaigrissement, rarement fièvre) ou respiratoire (augmentation de la toux, de l'encombrement, du volume et de la purulence des crachats, de la gêne respiratoire) ; elles nécessitent une consultation rapide. »³

Au niveau digestif, la mucoviscidose entraîne une insuffisance pancréatique se présentant sous forme de malabsorptions pouvant entraîner des retards de croissance et un diabète à long terme. Les anomalies de sécrétion biliaire entraînent également une destruction hépatique avec évolution possible vers la cirrhose.

³ HAS. Guide Affection Longue Durée. Mucoviscidose. Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. Novembre 2006. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/07-025-mucoviscidose-guide_sans_lap.pdf

f. Traitements

Dans cette partie nous détaillerons particulièrement les traitements antibiotiques susceptibles d'être impliqués dans l'émergence d'*A. xylosoxidans* ainsi que leur mode d'administration par inhalation, fréquemment utilisé dans la mucoviscidose.

i) Généralités

A l'heure actuelle les traitements sont à visée symptomatique et reposent essentiellement sur la prise en charge respiratoire et la prise en charge digestive et nutritionnelle. Le dépistage néonatal permet de mettre en place des mesures précoces : mesures de prévention (hygiène, vaccins), kinésithérapie, dépistage et traitement précoces des surinfections, nutrition, dépistage et traitement du diabète.

Dans la très grande majorité des cas, en France, les malades sont orientés vers un des 49 CRCM (Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose) où ils sont suivis à long terme. Les CRCM sont des centres spécialisés permettant une prise en charge pluridisciplinaire des malades (infirmière coordinatrice, médecin référent, kinésithérapeute, diététicienne, psychologue, assistante sociale, pneumologue, gastro-entérologue, ORL, diabétologue, gynécologue, radiologue, bactériologiste, chirurgien...). Habituellement des consultations systématiques sont organisées au minimum tous les mois jusqu'à un an puis tous les 3 mois, voire plus en cas de phases d'exacerbation aiguë.

Le rôle de l'infection broncho-pulmonaire dans la morbidité et la mortalité de la mucoviscidose étant bien établi, les traitements à visée respiratoire se sont développés et reposent sur la kinésithérapie respiratoire quotidienne, les fluidifiants bronchiques (RhDNase PULMOZYME®), les bronchodilatateurs, la corticothérapie, l'antibiothérapie, et l'oxygénothérapie.

La greffe pulmonaire est envisagée en dernier recours.

ii) Vaccins

Chez les patients atteints de mucoviscidose il est recommandé d'une part de pratiquer les mêmes vaccinations habituelles que celles préconisées pour la population générale (diphtérie, tétanos, poliomyélite, coqueluche, *Haemophilus influenzae* de type b, pneumocoque, hépatite B). D'autre part, il est recommandé de pratiquer d'autres vaccinations afin de prévenir les pathologies entraînant potentiellement une atteinte respiratoire ou hépatique : varicelle, grippe, rougeole, oreillons, rubéole, BCG, hépatite A (Iordache *et al.* 2012).

Des vaccins anti-pyocyanique, anti-VRS et anti-staphylococcique, qui pourraient présenter un intérêt certain chez ces malades sont en cours d'étude.

iii) Aérosolthérapie

L'aérosolthérapie fait partie des gestes quotidiens des patients. La voie inhalée présente l'avantage de permettre la diffusion de l'antibiotique directement dans les voies respiratoires avec une concentration importante tout en minimisant les effets secondaires systémiques.

Différents types d'appareils permettent la nébulisation des antibiotiques. Il existe à l'heure actuelle 3 grands types de nébuliseurs : les appareils pneumatiques (les plus répandus), les nébuliseurs électroniques à tamis vibrants, et les appareils ultrasoniques. Ces derniers ne sont plus utilisés dans la mucoviscidose, car ils ne sont pas adaptés à certains aérosols et à la désinfection nécessaire dans le cadre de cette maladie.

Les deux nébuliseurs électroniques disponibles sur le marché en France sont l'eFlow rapid® et l'atomisor pocket®. Ils présentent l'avantage d'être légers, silencieux, et plus rapides d'utilisation. Cependant ils nécessitent un entretien rigoureux.

Les protocoles de décontamination sont essentiels dans la mucoviscidose. En effet des études ont montré que les nébuliseurs pouvaient être des sources d'infections à *P. aeruginosa* (Pitchford *et al.* 1987), *B. cepacia* complex, ou *S. maltophilia* (Hutchinson *et al.* 1996). La contamination du matériel de nébulisation peut s'effectuer par l'intermédiaire des personnes le manipulant ou l'utilisant (patient, membre de la famille, personnel de soin...) ou de sources environnementales, parfois méconnues : solutions médicamenteuses contaminées, eau du robinet utilisée pour remplir les cuves de refroidissement des appareils ultrasoniques ou pour rincer les nébuliseurs après nettoyage (Reychler *et al.* 2007; Heijerman *et al.* 2009)

Les procédures de décontamination représentent une contrainte importante pour les patients, d'autant que plusieurs séances sont nécessaires dans la journée pour une meilleure efficacité du traitement. Ces procédures comprennent une étape de nettoyage soigneux à l'aide de liquide vaisselle de l'appareil entièrement démonté, suivi d'une désinfection et du séchage.

Il existe différentes méthodes de désinfection : les méthodes chimiques et thermiques. Les méthodes chimiques consistent à faire tremper les parties de l'appareil dans des solutions désinfectantes : eau de Javel diluée ou autres produits, le plus souvent à base d'ammoniums quaternaires: sachets Bactyneb®, Aniosyme®. Cette désinfection est suivie d'un rinçage à l'eau du robinet.

Les méthodes thermiques consistent à porter à ébullition les parties de l'appareil pendant 5 minutes ou à utiliser un désinfecteur thermique (type stérilisateur à biberons).

Il est cependant important de noter que pour les appareils à tamis vibrants, qui sont de plus en plus utilisés car moins contraignants, l'eau de Javel ne peut être utilisée car elle endommage la membrane. Le fabricant recommande une méthode thermique. Quel que soit le type d'appareil utilisé, le nébuliseur doit être nettoyé après chaque utilisation et désinfecté une fois par jour.

iv) Traitements antibiotiques

Les médicaments et les protocoles thérapeutiques diffèrent beaucoup d'un pays à l'autre et même d'un centre à l'autre. Il est cependant communément admis que certains agents pathogènes comme *P. aeruginosa* doivent être éradiqués dès le premier isolement dans le tractus respiratoire pour éviter les colonisations chroniques, mais aucun consensus international n'a validé le meilleur protocole.

La dernière conférence de consensus française date de 2002 (Société Française de Pédiatrie, ANAES⁴. et la Haute Autorité de Santé a fait paraître en 2006 un protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) concernant l'Affection Longue Durée « Mucoviscidose ». ⁵

⁴ Société Française de Pédiatrie, ANAES. Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. Conférence de consensus ; nov 2002 ; Paris, France.

⁵ HAS. Guide Affection Longue Durée. Mucoviscidose. Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. Novembre 2006. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/07-025-mucoviscidose-guide_sans_lap.pdf

Il existe des recommandations européennes concernant les primocolonisations et les exacerbations provoquées par *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *B. cepacia* complex, les dernières datant de 2012 (Doring *et al.* 2012). Enfin concernant les pathogènes émergents comme *S. maltophilia* ou *A. xylosoxidans*, il n'existe pas de consensus concernant la nécessité ou non de traiter et les pratiques diffèrent beaucoup d'un centre à l'autre. Dans les recommandations européennes de 2012, seuls les antibiotiques pouvant être administrés sont énumérés mais pas les situations dans lesquelles ils doivent être prescrits.

Trois modes d'administration sont utilisés pour les antibiothérapies : la voie inhalée par le biais des nébuliseurs, la voie orale et la voie intraveineuse.

✓ ***Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae***

D'après le PNDS, le traitement mis en place est généralement par voie orale et d'une durée minimum de 15 jours en monothérapie ou bithérapie associant 2 molécules parmi les β -lactamines (céphalosporines de 1^{ère} génération ou amoxicilline + acide clavulanique), macrolides, pristinamycine, triméthoprime-sulfaméthoxazole, rifampicine, acide fusidique, linézolide si résistance aux autres antibiotiques, cyclines, et fluoroquinolones. En cas d'échec, il faut mettre en place une antibiothérapie par voie intraveineuse (β -lactamines, aminosides, glycopeptides).

Grâce à ce traitement, le plus souvent l'éradication de *S. aureus* est obtenue (Doring and Hoiby 2004). Dans quelques cas cependant, la souche persiste par exemple sous forme de SCV rendant sa détection difficile dans les prélèvements.

✓ ***Pseudomonas aeruginosa***

Les antibiotiques utilisables pour le traitement des colonisations ou exacerbations dues à *P. aeruginosa* sont en France (d'après l'avis de l'HAS du 12 février 2012⁶) :

- **les traitements par voie inhalée** : la tobramycine pour les plus de 6 ans (TOBI[®] 300 mg/5ml, solution pour inhalation par nébuliseur, TOBI podhaler[®] 28 mg, poudre pour inhalation en gélules), la colistine (COLIMYCINE[®] 1 MUI, poudre et solvant pour inhalation par nébuliseur), et l'aztréonam-lysine pour les plus de 18 ans (CAYSTON[®] solution pour inhalation par nébuliseur).

- **par voie intraveineuse** : les β -lactamines : la ticarcilline (+/- acide clavulanique), la pipéracilline (+/- tazobactam si > 8 ans), la ceftazidime, l'aztréonam (adultes), les carbapénèmes : imipénème, méropénème (chez l'adulte), les aminosides : (tobramycine, amikacine), la colistine et enfin la ciprofloxacine (> 5 ans).

- **par voie orale** : la ciprofloxacine et l'azithromycine (en tant qu'anti-inflammatoire).

En pratique, afin de retarder le plus possible une colonisation chronique, la stratégie la plus reconnue à l'heure actuelle consiste à traiter les primo-colonisations par *P. aeruginosa* de façon précoce et intensive. Cette stratégie est décrite notamment dans un consensus européen datant de 2012 (Doring *et al.* 2012) avec l'utilisation de tobramycine inhalée pendant 28 jours. Cependant d'autres protocoles d'efficacité similaire peuvent être utilisés.

D'après le PNDS (2006), **la primocolonisation** par *P. aeruginosa* peut être traitée soit par nébulisation seule (colistine ou tobramycine), soit par nébulisation associée à la ciprofloxacine *per os*, soit par une association d'antibiotiques par voie IV (bêta-lactamine + aminoside). Cette première cure de 14 à 21 jours est le plus souvent suivie d'un traitement d'entretien par antibiotiques inhalés (colistine pendant 3 à 6 mois).

Le traitement des **infections chroniques** est différent :

- En cas d'exacerbation : bithérapie par voie IV (β -lactamine + aminosides) choisie en fonction des résultats du dernier antibiogramme et des réponses aux traitements antérieurs, pendant au moins 14 jours ; trithérapie si souches multirésistantes ou si association de plusieurs microorganismes.

⁶HAS. Commission de la Transparence. CAYSTON 75 mg poudre et solvant pour inhalation. Avis du 15 février 2012. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-03/cayston_15022012_avis_ct8345.pdf

- Traitement d'entretien : antibiotiques inhalés. En alternative, bithérapie trimestrielle systématique par voie veineuse pendant au moins 14 jours. La ciprofloxacine *per os* associée à un autre antibiotique par voie inhalée entre 2 traitements par voie veineuse est possible. Les cures peuvent être très rapprochées chez l'adulte, voire en continu.

L'antibiothérapie préventive n'a pour l'instant pas montré d'efficacité. Elle n'est donc pas recommandée à l'heure actuelle (Doring *et al.* 2012).

✓ **Stenotrophomonas maltophilia**

Le traitement de choix utilisé contre *S. maltophilia* est l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole (Waters 2012). Cependant les résistances acquises à cet antibiotique sont de plus en plus fréquentes. Les autres molécules actives sont l'association ticarcilline - acide clavulanique, et les fluoroquinolones (Waters 2012). Récemment, une forme inhalée d'aztréonam (aztréonam-lysine) a été mise sur le marché. Certains auteurs émettent l'hypothèse que sous cette forme, l'aztréonam pourrait avoir une efficacité contre *S. maltophilia* pourtant naturellement résistant. La concentration obtenue localement (1000 fois supérieure à celle atteinte lors de thérapies intraveineuses) permettrait de dépasser les capacités d'hydrolyse de la β -lactamase L2 constitutive produite par *S. maltophilia* (Waters 2012).

✓ **Burkholderia cepacia complex**

BCC est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques : β -lactamines, aminosides et triméthoprim-sulfaméthoxazole. Le traitement des infections nécessite une double voire triple antibiothérapie synergique, les molécules le plus efficaces étant le méropénème, la ceftazidime, et les aminosides en association. Des études ont montré que l'association du méropénème à la tobramycine et à un 3^e antibiotique permettait d'avoir une action bactéricide sur plus de 80% des souches (Waters 2012).

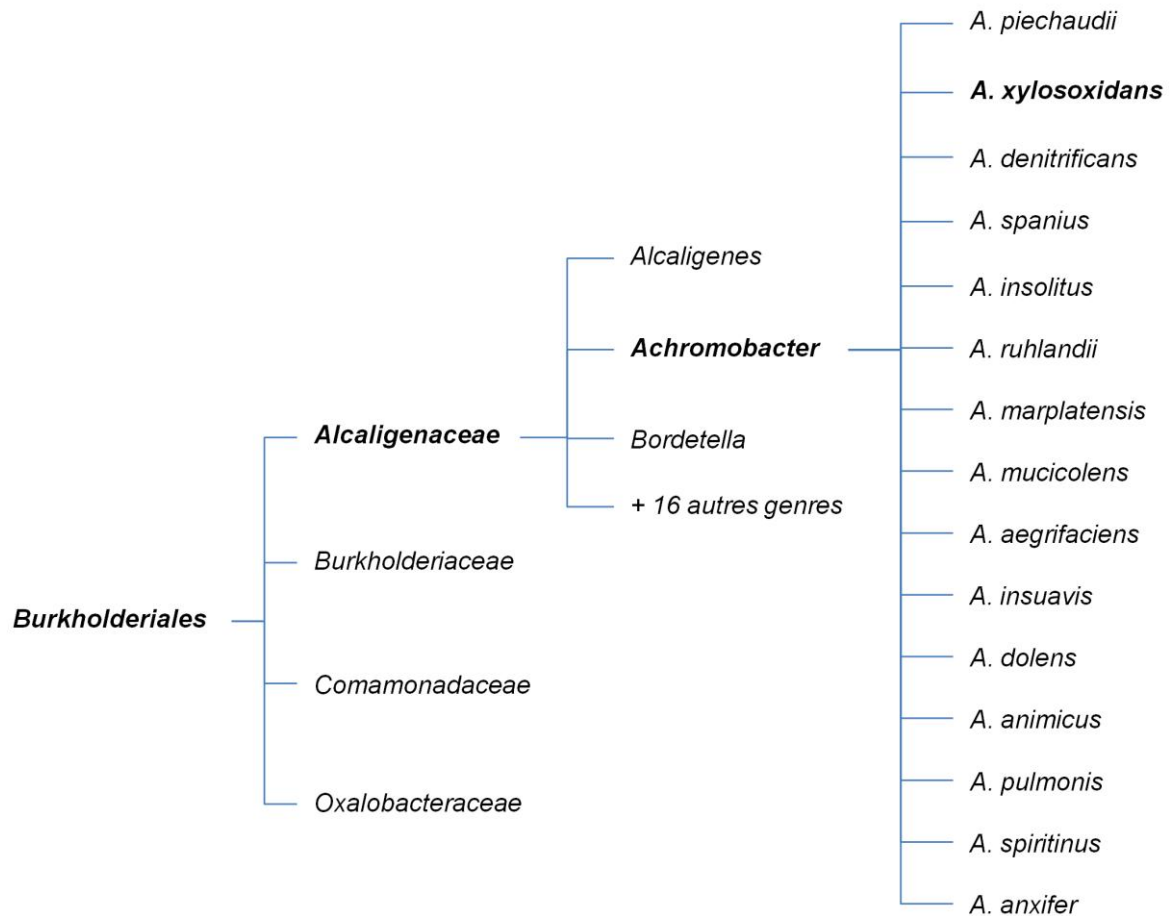


Figure 7 : Position taxonomique de l'espèce *Achromobacter xylosoxidans*
 (d'après <http://www.bacterio.net/a/achromobacter.html>)

B. GENERALITES SUR *A. XYLOSOXIDANS*

Achromobacter xylosoxidans est un bacille à Gram négatif non fermentaire. Cette bactérie aérobie stricte a été décrite pour la première fois dans un prélèvement d'otorrhée (Yabuuchi and Oyama 1971).

a. Taxonomie : Le genre *Achromobacter*

Le nom *Achromobacter* vient du grec ancien « *achromus* » signifiant sans couleur et de « *bacteria* » pour bâton ou bacille.

Si le genre *Achromobacter* a été décrit pour les premières fois en 1891 par Eisenberg, en 1923 par Bergey, puis en 1971 dans un prélèvement d'otorrhée (Yabuuchi and Oyama 1971). Il n'a été inclus dans la liste officielle des noms de bactéries : « Approved Lists of Bacterial Names. » par Yabuuchi et Yano qu'en 1981. (Yabuuchi and Yano 1981). Ce genre n'incluait à l'origine qu'une seule espèce : *Achromobacter xylosoxidans* avec pour espèce type *A. xylosoxidans* ATCC 27061 (Brusse and Auling 2005).

L'espèce *Achromobacter xylosoxidans* a par la suite subi de nombreux remaniements de nomenclature, comme beaucoup de bactéries ces 30 dernières années, parallèlement au développement des techniques utilisées en taxonomie bactérienne.

Le genre *Achromobacter* appartient à la famille des *Alcaligenaceae* au sein de l'ordre des *Burkholderiales*.

L'ordre des *Burkholderiales* est placé dans la classe des *Betaproteobacteria* (phylum des "*Proteobacteria*", domaine ou empire des "*Bacteria*" ou des "*Eubacteria*").

Il est constitué de quatre familles : *Alcaligenaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae* et *Oxalobacteraceae*. (Voir Figure 7).

Bacteria > *Proteobacteria* > *Betaproteobacteria* > *Burkholderiales* > *Alcaligenaceae* > *Achromobacter*

Des études de taxonomie polyphasique (phénotypiques, génotypiques, phylogénétiques) ont permis d'inclure les espèces *Alcaligenes ruhlandii*, *Alcaligenes piechaudii* et *Alcaligenes denitrificans* au sein du genre *Achromobacter* (Yabuuchi *et al.* 1998), puis de nouvelles espèces ont été décrites au sein de genre.

Les différentes espèces constituant le genre *Achromobacter* sont⁷ : (Figure 7 et Annexe 1).

-*Achromobacter xylosoxidans* : avec les dénominations successives suivantes :

* *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Ohyama 1971)

* *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* (Kerstens and De Ley 1984).

* *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (Kiredjian *et al.* 1986)

* *Alcaligenes xylosoxidans* (Kiredjian *et al.* 1986)

* *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (Yabuuchi *et al.* 1998)

(Depuis 2003, l'appellation *Achromobacter xylosoxidans* est couramment utilisée (Coenye *et al.* 2003a))

- *Achromobacter denitrificans* (Rüger and Tan 1983) (Coenye *et al.* 2003)

- *Achromobacter insolitus*, (Coenye *et al.* 2003b)

- *Achromobacter spanius* (Coenye *et al.* 2003b)

- *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian *et al.* 1986) (Yabuuchi *et al.* 1998)

- *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac 1955) (Yabuuchi *et al.* 1998)

- *Achromobacter marplatensis* (Gomila *et al.* 2011)

En 2012 des études génétiques de type MLST (Multilocus Sequence Typing) (voir page 47) ont mis en évidence la complexité phylogénétique au sein du genre *Achromobacter*, avec 4 (Ridderberg *et al.* 2012) à 14 (Spilker *et al.* 2012) nouvelles autres espèces ou génogroupes.

⁷ <http://www.bacterio.net/a/achromobacter.html>

En 2012 et 2013, l'équipe de Vandamme a proposé 8 nouvelles espèces (Vandamme *et al.* 2012) (Vandamme *et al.* 2013) :

- *Achromobacter mucicolens*

- *Achromobacter animicus*

- *Achromobacter spiritinus*

- *Achromobacter pulmonis*

- *Achromobacter insuavis*

- *Achromobacter aegrifaciens*

- *Achromobacter anxifer*

- *Achromobacter dolens*

Toutes les nouvelles espèces proposées à partir des techniques de MLST ont pu être isolées au sein d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose à l'exception d'*A. spiritinus* (expectoration de patient non atteint de mucoviscidose).

Ces études ont par ailleurs montré que parmi les souches identifiées comme *A. xylosoxidans* dans la mucoviscidose auparavant, il existait probablement une proportion non négligeable d'espèces autres qu'*A. xylosoxidans* (environ la moitié). Dans l'étude Spilker 42% des souches du genre *Achromobacter* isolées chez 341 patients atteints de mucoviscidose ont été identifiées comme *A. xylosoxidans* et environ le quart comme *A. ruhlandii*. Dans l'étude de Ridderberg portant sur 56 souches cliniques identifiées comme *A. xylosoxidans* par les laboratoires, 64% appartenaient réellement à l'espèce *A. xylosoxidans*, 18% à une espèce inconnue et 7 % à l'espèce *A. ruhlandii*. Cette équipe a montré également que la souche épidémique (clone DES : Danish epidemic strain), initialement identifiée comme *A. xylosoxidans* dans les publications, était en réalité une souche d'*A. ruhlandii* (Ridderberg *et al.* 2012).

Ces 8 espèces n'ont été décrites que sur le plan génétique et biochimique. Nous ne disposons par contre d'aucune donnée sur leur profil de sensibilité aux antibiotiques.

Rq : *Achromobacter arsenitoxydans* SY8 (décrite pour sa capacité à oxyder l'arsénite) (Li *et al.* 2012) est rattachée au genre *Achromobacter* également mais ne constitue pas à l'heure actuelle une espèce reconnue dans « Approved Lists of Bacterial Names ».

b. Caractères bactériologiques

A. xylosoxidans est un bacille à Gram négatif non fermentaire, aérobic strict, dont l'habitat est inconnu. Le GC% est élevé chez cette espèce bactérienne (environ 70%).

Il possède une cytochrome -oxydase, une catalase et une nitrate réductase. Les réactions aux tests uréase, lysine décarboxylase, phénylalanine désaminase, arginine dihydrolase et gélatinase sont négatives. Il possède une mobilité grâce à une ciliature péritriche. Il oxyde le glucose et également le xylose, d'où son nom « *xylosoxidans* ». Ce bacille cultive sur milieux ordinaires à 30°C, à 37°C, à 42°C mais pas à 4°C. Il est capable également de dénitrification (réduction des nitrates en nitrites et des nitrites en azote), cette capacité lui permettant de survivre en anaérobiose en présence de nitrates. Il forme en 24 à 48h des colonies rondes, non pigmentées et non hémolytiques, contrairement à de nombreuses espèces de *Pseudomonas*. Il cultive également sur les géloses sélectives des bacilles à Gram négatif de type Mac Conkey ou Drigalski, et sur gélose cétrimide comme *P. aeruginosa* en raison de sa résistance aux ammoniums quaternaires (Brusse and Auling 2005; Wirsing von Konig *et al.* 2011). Ceci peut conduire parfois à des confusions d'identification.

c. Méthodes d'identification et de génotypage

A. xylosoxidans est une bactérie difficile à identifier en routine par les techniques conventionnelles biochimiques. C'est pourquoi de nouvelles techniques sont en cours de développement (protéomique et génomique).

i) Techniques biochimiques conventionnelles

Au laboratoire, l'identification de cette bactérie repose sur des tests biochimiques réalisés en galeries d'identification classiques, comme la galerie Api 20 NE en 48h ou VITEK 2 ID-GNB (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) (en 24h). Ces techniques permettent d'identifier les espèces *A. xylosoxidans* et *A. denitrificans*. En 2001 une étude montrait que le système Api 20 NE était satisfaisant pour distinguer *A. xylosoxidans* d'autres bacilles à Gram négatif non fermentaires comme *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* ou *B. cepacia* complex (Saiman *et al.*

2001). Ces travaux soulèvent néanmoins le risque de confusions d'identification avec d'autres BGNF, et notamment *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose. Dans cette étude 12 souches identifiées comme *A. xylosoxidans* par le laboratoire d'origine s'avéraient être des souches de *P. aeruginosa* (n=10), *S. maltophilia* et *B. cepacia* complex.

Cependant des études montrent dès 2006 que si la galerie ne donne pas une identification « excellente » ou « très bonne », seul le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S permet une identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires. (Bosshard *et al.* 2006). *A. xylosoxidans* fait d'ailleurs partie des espèces les moins bien identifiées par les galeries biochimiques dans cette étude. Par la suite d'autres travaux ont souligné le risque de confusions d'identifications entre *A. xylosoxidans* et *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet chez ces patients il n'est pas rare d'isoler des souches de *P. aeruginosa* atypiques, non pigmentées par exemple (De Baets *et al.* 2007). L'utilisation en particulier de critères de température de croissance ou de culture sur milieu cétrimide est source d'erreur. Ceci a été confirmé par l'étude de Kidd (Kidd *et al.* 2009) qui a montré que 40% des souches identifiées à tort par les laboratoires comme *P. aeruginosa* chez des patients atteints de mucoviscidose étaient en réalité des souches d'*A. xylosoxidans*. Un contrôle de qualité européen portant sur des souches de patients atteints de mucoviscidose a montré également que les souches d'*A. xylosoxidans* étaient souvent mal identifiées par les laboratoires. (Hogardt *et al.* 2009). De plus ces techniques biochimiques ne permettent pas d'identifier les autres espèces d'*Achromobacter* qui peuvent pourtant être isolées également dans les prélèvements biologiques.

ii) Techniques de protéomique (Spectrométrie de masse) :

✓ Principe de la technique

Ces dernières années la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry) est de plus en plus utilisée pour l'identification bactérienne. Les appareils sont simples d'utilisation et l'obtention des résultats est rapide. Cette technique permet d'obtenir, à partir d'une colonie, un spectre représentant les masses des différents constituants protéiques la bactérie. Ce spectre est caractéristique d'une espèce bactérienne. Ainsi, en confrontant les résultats à une banque de données, on obtient l'identification de la bactérie.

Deux principaux appareils sont actuellement commercialisés : l'appareil de Bruker (Bruker Biotyper) et celui de bioMérieux (Vitek MS).

Les banques de données sont actualisées régulièrement. Actuellement la banque de données mise à disposition par Bruker possède des souches de référence de différentes espèces d'*Achromobacter* : 5 souches d'*A. xylosoxidans*, 3 souches d'*A. denitrificans*, 1 souche d'*A. insolitus*, 2 souches d'*A. piechaudii*, 1 souche d'*A. ruhlandii*, 2 souches d'*A. spanius* et 2 souches dénommées *Achromobacter sp.*, ceci depuis 2011.

A titre de comparaison, les souches d'*E. coli* sont au nombre de 11, celles de *P.aeruginosa* au nombre de 6 et celles de *S.aureus* au nombre de 12.

✓ Applications pour l'identification d'*A. xylosoxidans*

En 2008 une étude comparative portant sur 54 souches d'*A. xylosoxidans* identifiées par des techniques usuelles (API 20NE ou séquençage du gène *rrs*) montrait que la spectrométrie de masse était fiable pour l'identification (Degand *et al.* 2008). Cependant ces 54 souches n'avaient été isolées que chez seulement 12 patients (atteints de mucoviscidose), ce qui limite la diversité des souches incluses dans l'étude.

Une étude de 2012 portant sur 21 souches identifiées *A. xylosoxidans* par les techniques conventionnelles montre une bonne concordance d'identification au genre. Pour 12 d'entre elles cependant les résultats d'espèce étaient discordants, avec des souches identifiées *A. ruhlandii* par MALDI-TOF (Desai *et al.* 2012). Une dernière étude décrit également une bonne concordance entre MALDI-TOF (Bruker) et la galerie biochimique API 20 NE pour 3 souches d'*A. xylosoxidans*. Pour 12 souches identifiées *Achromobacter sp.* par le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, la technique MALDI-TOF ne permettait que de conclure pour l'identification au genre (Marko *et al.* 2012).

La technique de MALDI-TOF semble donc efficace pour identifier le genre *Achromobacter*, cependant cette technique n'est probablement pas assez discriminante pour le diagnostic d'espèce au sein du genre *Achromobacter*. L'actualisation et l'enrichissement des banques de données permettront probablement d'améliorer ces résultats.

iii) Techniques d'identification par biologie moléculaire

1. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (rrs)

✓ Principe de la technique

Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (d'environ 1,5 kb) est présent chez tous les procaryotes. Ce gène présente à la fois des parties bien conservées chez toutes les bactéries et des parties variables d'une espèce à une autre. Le séquençage de ces parties variables est suffisamment discriminant pour différencier les espèces bactériennes. Le principe de cette technique d'identification est simple. Tout d'abord on amplifie le gène en utilisant des amorces s'hybridant dans les parties communes à toutes les bactéries. Puis après séquençage de la partie amplifiée, la comparaison aux banques de données permet d'identifier l'espèce en présence. Longtemps utilisée dans les études phylogénétiques, cette technique est largement utilisée pour l'identification bactérienne depuis les années 2000 environ. (Kolbert and Persing 1999; Patel 2001).

✓ Application dans le cadre de l'identification d'*A. xylosoxidans*

Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a été proposé comme technique d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGNF) dans le cadre de la mucoviscidose dès 2002 (Ferroni *et al.* 2002). Dans cette étude, les auteurs suggèrent d'identifier par cette technique tous les BGNF qui ne présentent pas de bons résultats avec la galerie Api 20NE, à savoir une « très bonne identification » ou une « excellente identification ». Une étude en 2006 (Bosshard) confirme ces résultats, et met en évidence que pour la moitié des souches d'*A. xylosoxidans* de l'étude (soit 6 souches), les galeries Api 20 NE ne fournissent pas de bonnes identifications. Les mêmes conclusions sont données pour la galerie biochimique Vitek 2 (Zbinden *et al.* 2007).

Le séquençage du gène *rrs* devient alors la technique d'identification de référence utilisée dans les études.

Pour l'analyse de routine les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)⁸ préconisent l'utilisation de cette technique sur les isolats pour lesquels les techniques biochimiques ne donnent pas de résultats satisfaisants.

Cependant l'interprétation est parfois difficile du fait de la proximité génétique des différentes espèces du genre *Achromobacter* et du manque de souches autres que celles d'*A. xylosoxidans* référencées dans les banques de données (Ferroni *et al.* 2002; Bosshard *et al.* 2006). En effet le gène *rrs* ne diffère que de quelques nucléotides d'une espèce à l'autre au sein du genre *Achromobacter*. Le séquençage du gène codant pour l'ARN_r 16S ne serait donc fiable que pour l'identification du genre, mais insuffisamment discriminante pour l'identification de l'espèce.

2. Techniques de Multilocus Sequence Typing (MLST) ou Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

En 2012, deux équipes ont confirmé par des techniques de MLST (Multilocus Sequence Typing) (Spilker *et al.* 2012) ou MLSA (Multilocus Sequence Analysis) (Ridderberg *et al.* 2011) que le séquençage du gène *rrs* ne permettait pas de différencier les espèces du genre *Achromobacter*. Ces techniques sont avant tout des techniques de génotypage utilisées pour les études de taxonomie bactérienne et reposant sur le séquençage de plusieurs gènes de ménage (de 5 à 7) (Maiden *et al.* 1998). L'analyse des séquences permet par la suite de construire des arbres phylogénétiques.

Ces deux équipes ont ainsi mis à jour de nouvelles espèces au sein du genre *Achromobacter* (voir B-1). Il est montré également que des espèces autres qu'*A. xylosoxidans* peuvent être isolées chez un nombre important de patients atteints de mucoviscidose.

Seules ces techniques de MLST permettraient donc d'identifier *A. xylosoxidans* de manière fiable à l'heure actuelle. Ainsi depuis 2012, elles sont de plus en plus utilisées dans les publications pour l'identification de l'espèce au sein du genre *Achromobacter* (Barrado *et al.* 2013; Hansen *et al.* 2013; Papalia *et al.* 2013; Traglia *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013).

⁸ **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; approved guideline. CLSI document MM18-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

L'équipe de Spilker a déposé son schéma de MLST ainsi qu'une base de données sur le site <http://pubmlst.org/achromobacter/>. Ceci permet à tout laboratoire d'utiliser son schéma et d'identifier la position taxonomique de ses isolats.

Cette technique présente l'inconvénient majeur d'être très lourde à mettre en application dans un laboratoire en routine. Une technique « simple » d'identification d'*A. xylosoxidans* n'est donc pas encore disponible.

3. Autres techniques d'identification :

✓ Détection du gène *rrs* avec des amorces spécifiques d'*A. xylosoxidans* :

En 2002, face aux difficultés rencontrées avec les techniques biochimiques de routine, une équipe a tenté de mettre au point une PCR spécifique de l'espèce *A. xylosoxidans* ciblant le gène *rrs*. Contrairement à la technique d'identification classique utilisant des amorces s'hybridant dans des zones conservées du gène, cette technique consiste à utiliser des amorces s'hybridant dans les zones variables spécifiques d'*A. xylosoxidans* au sein du gène *rrs* (Liu *et al.* 2002). Cependant ce gène étant très conservé au sein du genre *Achromobacter*, des réactions positives sont également obtenues avec d'autres espèces du genre *Achromobacter*. Cette technique ne permet donc de conclure que pour l'identification du genre.

✓ Détection du gène codant pour la β -lactamase constitutive OXA-114

En 2008 la β -lactamase constitutive OXA-114 a été décrite chez *A. xylosoxidans* (Doi *et al.* 2008). Par la suite, la détection du gène *bla*_{OXA-114} a été proposée pour l'identification de cette espèce en 2011 (Turton *et al.* 2011). Turton conclut que la détection du gène permet d'identifier *A. xylosoxidans*. Cette technique présente néanmoins des limites : tout d'abord l'absence de détection du gène ne permet pas de conclure pour l'identification. De plus des études ultérieures ont montré que les amorces de PCR décrites par Turton n'étaient pas spécifiques d'*A. xylosoxidans*. Les réactions d'amplification peuvent être également positives avec d'autres espèces d'*Achromobacter* (Barrado *et al.* 2013), et en particulier avec *A. ruhlandii*. Cette dernière espèce possède l'oxacillinase constitutive OXA-258, qui diffère d'une quarantaine d'acides aminés par rapport à OXA-114. Le gène *bla*_{OXA-258} est amplifié avec les amorces décrites par Turton (Papalia *et al.* 2013).

- ✓ **Séquençage du gène *nrdA*** (codant pour la sous-unité α de la ribonucleoside diphosphate réductase)

Dans une communication très récente en 2013, Spilker et al. (Spilker *et al.* 2013) ont comparé les résultats du séquençage du gène *nrdA* seul avec ceux obtenus avec leur technique de MLST (séquençage de 7 gènes) dans l'identification des différentes souches d'*Achromobacter*. Cette étude conclut que le séquençage de 765 pb de ce gène est suffisamment discriminant pour l'identification des différentes espèces au sein du genre *Achromobacter*. Sur le site <http://pubmlst.org/achromobacter/>, il est possible pour tout laboratoire de confronter ses résultats avec la base de données.

Conclusion techniques d'identification

Depuis la première description d'*Achromobacter xylosoxidans* en 1971, les nouvelles techniques de taxonomie ont permis de montrer qu'il existe un nombre important d'espèces phylogénétiquement proches au sein du genre *Achromobacter*. Il s'avère que la plupart des techniques disponibles sont fiables pour l'identification du genre, mais qu'elles posent des difficultés pour l'identification de l'espèce. La valeur du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, qui faisait référence jusqu'en 2012, est remise en question. Pour le diagnostic d'espèce, seules les techniques de MLST semblent suffisamment discriminantes.

Les efforts sont maintenant concentrés vers la description d'une technique simple d'identification utilisable en routine. Le séquençage du gène *nrdA* semble être la technique la plus simple à l'heure actuelle mais donc réservée aux laboratoires spécialisés. La spectrométrie de masse est une technique prometteuse, et il est possible qu'elle présente un jour un bon pouvoir discriminant si les banques de données sont actualisées et enrichies avec plus de souches et en particulier de toutes les espèces récemment décrites.

En conséquence de toutes ces données, la grande majorité des publications jusqu'en 2012 portent sur l'espèce *Achromobacter xylosoxidans* identifiée par méthodes biochimiques ou le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, les autres espèces n'étant pas ou mal identifiées par ces techniques. Depuis 2012, beaucoup d'études mentionnent plutôt le genre *Achromobacter* sp. et seules les souches ayant été identifiées par MLST sont dénommées *A. xylosoxidans*. Cette espèce regrouperait environ la moitié des isolats cliniques (Ridderberg *et al.* 2012; Hansen *et al.* 2013 ; Spilker *et al.* 2013). On voit par exemple émerger des publications portant sur *A. ruhlandii* ou *A. piechaudii*, espèces qui étaient probablement auparavant classées dans l'espèce *A. xylosoxidans*.

iv) Techniques de géotypage

Le géotypage bactérien a pour but de comparer entre elles des souches d'une même espèce bactérienne afin de déterminer si elles sont issues d'un même clone (souches isogéniques). Cette méthode est largement utilisée en épidémiologie dans le cadre de l'étude de la circulation des souches bactériennes, en cas de suspicion de cas groupés, notamment à l'hôpital, mais également dans les études de dissémination des souches environnementales. Le principe repose sur la comparaison des génomes des souches à étudier. Il existe pour cela différentes méthodes : les techniques de restriction enzymatique, les techniques d'amplification génique basées sur la polymérase chain reaction (PCR) et les techniques de séquençage de l'ADN. La méthode de référence à l'heure actuelle est celle de l'électrophorèse en champ pulsé.

v) Techniques de restriction enzymatique de l'ADN génomique

a. Electrophorèse en champ pulsé (ECP)

✓ Principe de la technique

L'électrophorèse en champ pulsé est une méthode de géotypage très utilisée chez les bactéries. Elle est considérée comme le « gold standard » en matière de géotypage. (Tenover *et al.* 1995) Le principe repose sur le clivage du génome bactérien en un faible nombre de fragments de grande taille par une enzyme de restriction. La séparation des fragments d'ADN est ensuite réalisée au cours d'une électrophorèse en champ pulsé, électrophorèse permettant de séparer de gros fragments d'ADN (> 10 kb) à l'aide d'un changement d'orientation du champ électrique. Les fragments d'ADN sont ensuite révélés par coloration au bromure d'éthidium. Les profils de macrorestriction obtenus, ou pulsotypes, sont ensuite comparés les uns aux autres. D'après Tenover, 2 souches sont considérées comme issues du même clone si moins de 3 bandes de différence sont observés (Tenover *et al.* 1995).

Cette technique est utilisée en épidémiologie pour un grand nombre d'espèces bactériennes. Elle permet de comparer les souches entre elles lors d'épisodes épidémiques, mais également dans le suivi des colonisations des patients, notamment dans le cadre de la mucoviscidose. Cette méthode présente l'inconvénient d'être longue, puisqu'elle nécessite environ 5 jours pour sa mise en œuvre.

✓ **Applications chez *A. xylosoxidans***

Concernant *A. xylosoxidans*, la technique d'ECP a été validée par Cheron en 1994 (Cheron *et al.* 1994). Puis elle a été largement utilisée par différentes équipes dans les études épidémiologiques portant sur les patients atteints de mucoviscidose infectés par *A. xylosoxidans* (Moissenet *et al.* 1997; Kanellopoulou *et al.* 2004; Doi *et al.* 2008; Lambiasi *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2011; Turton *et al.* 2011)

b. Restriction Length Fragment Polymorphism (RFLP)

✓ **Principe de la technique**

Cette méthode consiste à cliver l'ADN bactérien par une enzyme de restriction. Les fragments d'ADN séparés par électrophorèse sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose, puis révélés grâce à une sonde nucléique marquée, complémentaire des fragments d'ADN cibles. Ces cibles peuvent être les gènes codants pour les ARN ribosomaux, on parle alors de ribotypage. L'ECP est préférée à cette technique, car le pouvoir discriminant et la reproductibilité sont meilleurs (Bidet and Bingen 2012).

✓ **Application chez *A. xylosoxidans***

Le ribotypage peut être utilisé à des fins taxonomiques permettant de différencier les genres et les espèces bactériennes. Il a été utilisé chez *A. xylosoxidans* comme technique d'identification dans une étude (Clermont *et al.* 2001).

vi) Techniques d'amplification génique

a. Amplification des séquences répétitives (Rep-PCR, DiversiLab[®])

✓ Principe de la technique

Le génome bactérien contient des séquences consensus extragéniques (non codantes) répétitives et palindromiques, les séquences REP (Repetitive Extragenic Palindromic) de 38pb et les séquences ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) de 126 pb décrites à l'origine chez *E. coli* et *S. typhimurium* (Stern *et al.* 1984).

Ces séquences hautement conservées sont répétées de manière aléatoire et spécifique à chaque souche sur le génome bactérien. La rep-PCR est une technique de génotypage qui consiste à utiliser des amorces complémentaires aux séquences consensus afin d'amplifier spécifiquement les fragments d'ADN séparant ces séquences. Les fragments amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse. Les profils obtenus sont suffisamment discriminants pour différencier des souches au sein d'une même espèce. Cette technique a été décrite pour la première fois par Versalovic en 1991 (Versalovic *et al.* 1991).

Afin d'augmenter la rapidité et la reproductibilité de cette technique, un système semi-automatisé a été développé en 2005 (Healy *et al.* 2005): le système DiversiLab[®] (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France). Cette technologie permet un typage rapide et standardisé des souches par une technique de rep-PCR suivie d'une migration des fragments d'ADN amplifiés dans une puce par microcapillarité. L'analyse de la séparation est effectuée par un système informatique : chaque fragment amplifié correspond à un pic du spectre final. A chaque génotype différent correspond un spectre unique. Les résultats sont obtenus dans un délai d'environ 4 heures. Les profils générés sont analysés par le logiciel en ligne Diversilab[®] v3.3. Deux profils sont considérés comme distincts lorsqu'ils présentent moins de 95% de similarité ou plus de 2 pics de différence. Le système informatique permet la constitution de bases de données de profils et la comparaison entre différents laboratoires ayant accès à ces bases.

✓ **Application chez *A. xylosoxidans***

Chez *A. xylosoxidans*, des techniques de REP-PCR et ERIC-PCR ont été utilisées pour le génotypage dans quelques études. Dans l'étude de Dunne les techniques de REP-PCR et d'ERIC-PCR ont donné des résultats équivalents, mais il n'y avait pas de comparaison avec l'ECP. Dans une autre étude, la technique ERIC-PCR a montré un pouvoir discriminant moins fort qu'avec l'ECP dans la série de souches étudiées. (Moissenet *et al.* 1997). En revanche la technique automatisée DiversiLab® n'a jamais été utilisée dans les études.

b. RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA

✓ **Principe de la technique**

La RAPD repose sur l'amplification de l'ADN à l'aide d'amorces de petite taille de séquence aléatoire qui se fixent au hasard sur l'ADN cible. Les fragments obtenus sont révélés par électrophorèse en gel d'agarose. Cette technique rapide présente en revanche des problèmes de reproductibilité inter voire intra laboratoire, les profils obtenus dépendant des conditions de réaction.

✓ **Applications chez *A. xylosoxidans***

Cette technique de RAPD a été utilisée dans plusieurs études, certaines portant sur des souches de patients atteints de mucoviscidose (Krzewinski *et al.* 2001; Van Daele *et al.* 2005; Magni *et al.* 2010) mais sans la comparer à l'ECP. Une étude a cependant montré que l'ECP était la méthode la plus discriminante sur 92 isolats (Kaur *et al.* 2009).

vii) Techniques de séquençage de l'ADN génomique (MLST)

✓ Principe de la technique

Les techniques de séquençage de l'ADN génomique sont de plus en plus utilisées en épidémiologie, car elles permettent d'obtenir des données reproductibles et numérisables, c'est à dire comparables entre laboratoires (Bidet and Bingen 2012).

Comme vu précédemment, les techniques appelées MLST (Multilocus Sequence Typing) ou MLSA (Multilocus Sequence Analysis) reposent sur le séquençage de fragments de plusieurs gènes de ménage (de 5 à 7) (Maiden *et al.* 1998). La comparaison des séquences obtenues permet de construire des arbres phylogénétiques au sein desquels les souches sont regroupées en complexes clonaux ou ST (sequence types) Cette technique permet non seulement d'identifier les souches mais également de mener des études phylogénétiques. A l'heure actuelle c'est la technique de référence pour les études de collections de souches (Bidet and Bingen 2012). Selon le nombre et le type de gènes utilisés par la technique de MLST, celle-ci peut se révéler être plus ou moins discriminante que l'ECP. En effet, la technique de MLST n'analyse qu'une toute petite partie du génome contrairement à l'ECP. Ainsi, des souches appartenant à des génotypes différents peuvent être regroupées dans le même ST ou cluster. D'autre part il a été montré par exemple chez un patient atteint de mucoviscidose colonisé par *P. aeruginosa* que le typage par MLST pouvait changer au cours de l'évolution de la maladie alors que le profil obtenu en ECP était toujours le même (Garcia-Castillo *et al.* 2012).

Cette technique ne remplace pas l'ECP, elle est complémentaire puisqu'elle donne des informations différentes.

✓ Applications chez *A. xylosoxidans*

En 2012, deux techniques de MLST ont été décrites pour le genre *Achromobacter* (Ridderberg *et al.* 2012; Spilker *et al.* 2012). Elles sont utilisées pour identifier les espèces au sein du genre *Achromobacter*. (voir Identification p39).

d. Sensibilité aux antibiotiques

i) Phénotype de résistance naturelle

Très peu de données sont disponibles dans la littérature sur le phénotype de résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* aux antibiotiques.

En 1981, Yabuuchi et Yano décrivaient *A. xylosoxidans* avec des résistances naturelles aux β -lactamines, aux aminosides, et aux solutions désinfectantes de chlorhexidine (étude de 55 souches) (Yabuuchi and Yano 1981).

Par la suite, de rares études ont précisé le phénotype de résistance naturelle (Mensah *et al.* 1990; Philippon *et al.* 1990). *A. xylosoxidans* est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques (tous les aminoglycosides, toutes les cephalosporines hormis la ceftazidime, certaines quinolones), ce qui pourrait expliquer son émergence chez les patients atteints de mucoviscidose soumis à des cures d'antibiotiques itératives.

✓ Les aminosides

A. xylosoxidans est donc décrit comme naturellement résistant aux aminosides (kanamycine, tobramycine, amikacine, gentamicine, nétilmicine). Les travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont montré que cette résistance était due essentiellement au système d'efflux AxyXY-OprZ (Bador *et al.* 2013).

Cette résistance aux aminosides n'est pas retrouvée dans toutes les autres espèces d'*Achromobacter* mais les données sont rares.

✓ Les β -lactamines

Les β -lactamines sont des antibiotiques bactéricides qui agissent en inhibant la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne. Les cibles de ces molécules sont appelées PLP : Protéines Liant la Pénicilline. Selon leur structure, les β -lactamines sont classées en différents groupes, principalement les pénicillines (comprenant les aminopénicillines, les uréidopénicillines, les carboxypénicillines), les céphalosporines (comprenant 3 générations), les monobactames et les carbapénèmes (voir Annexe 2).

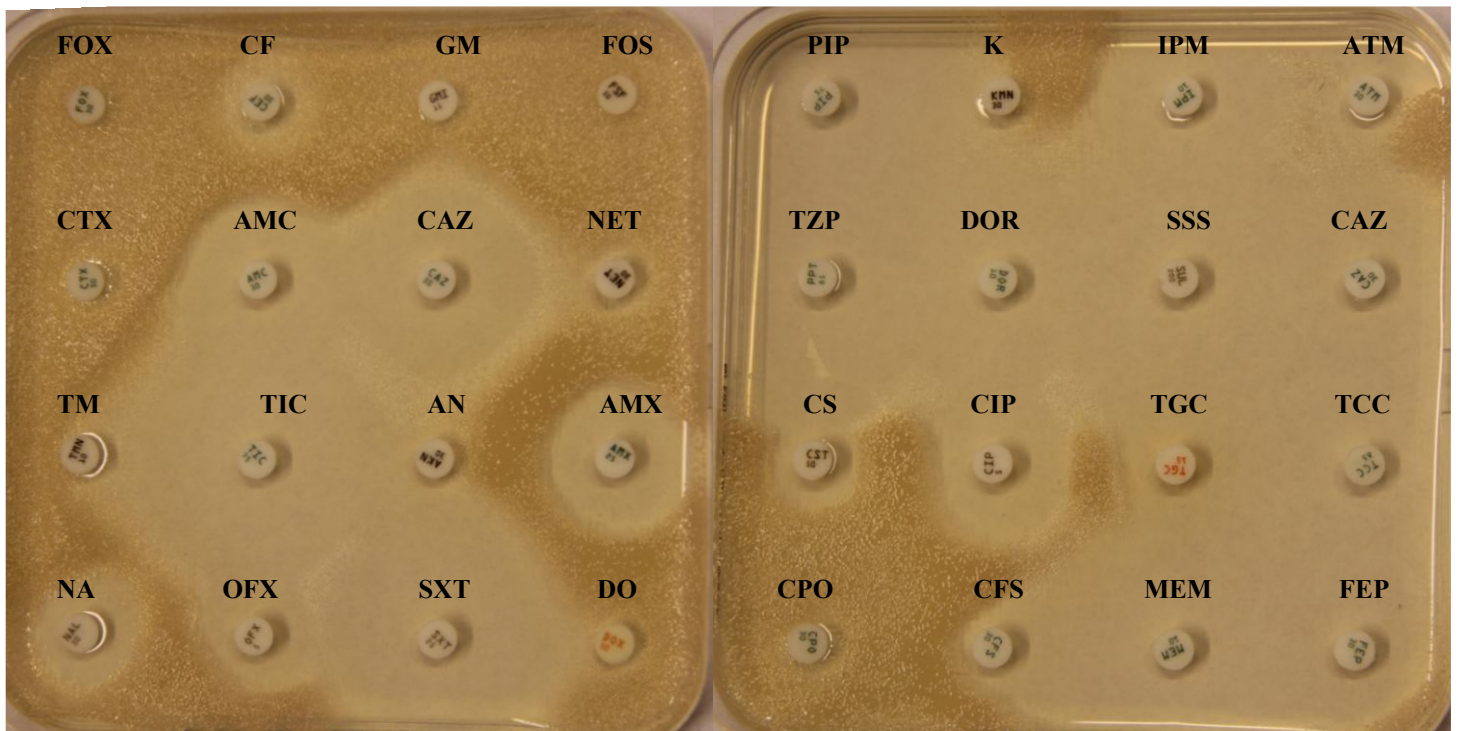


Figure 8 Exemple d'antibiogramme standard en milieu gélosé d'une souche d'*A. xylosoxidans*.

AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; AMX : amoxicilline ; AN : amikacine ; ATM : aztréonam ; CAZ : ceftazidime ; CF : céfalotine ; CFS : cefsulodine ; CIP : ciprofloxacine ; CPO : cefpirome ; CS : colistine ; CTX : céfotaxime ; DO : doxycycline ; DOR : doripénème ; FEP : céfépime ; FOS : fosfomycine ; FOX : céfoxitine ; GM : gentamicine ; IPM : imipénème ; K : kanamycine ; MEM : méropénème ; NA : acide nalidixique ; NET : nétilmicine ; OFX : ofloxacine ; PIP : pipéracilline ; SSS : sulfamides ; SXT : sulfaméthoxazole-triméthoprine ; TCC : ticarcilline + acide clavulanique ; TGC : tigécycline ; TIC : ticarcilline ; TM : tobramycine ; TZP : pipéracilline + tazobactam

A. xylosoxidans présente une grande sensibilité à la ticarcilline (carboxypénicilline), à la pipéracilline (uréidopénicilline) à la ceftazidime (céphalosporine de troisième génération : C3G) et aux carbapénèmes : imipénème, méropénème, doripénème. En revanche, la résistance est constante à l'aztréonam (monobactam) et à toutes les autres céphalosporines : céfalotine (C1G), céfoxitine, céfuroxime (C2G), ceftriaxone, céfépime (C3G) (voir Figure 8).

✓ **Autres classes d'antibiotiques**

D'après Philippon (l'antibiogramme), *A. xylosoxidans* est naturellement résistant à la fosfomycine, au triméthoprim, à certaines quinolones (acide nalidixique, pefloxacin) à la rifampicine. Cette espèce est naturellement sensible à la ciprofloxacine, à la colistine, et à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole.

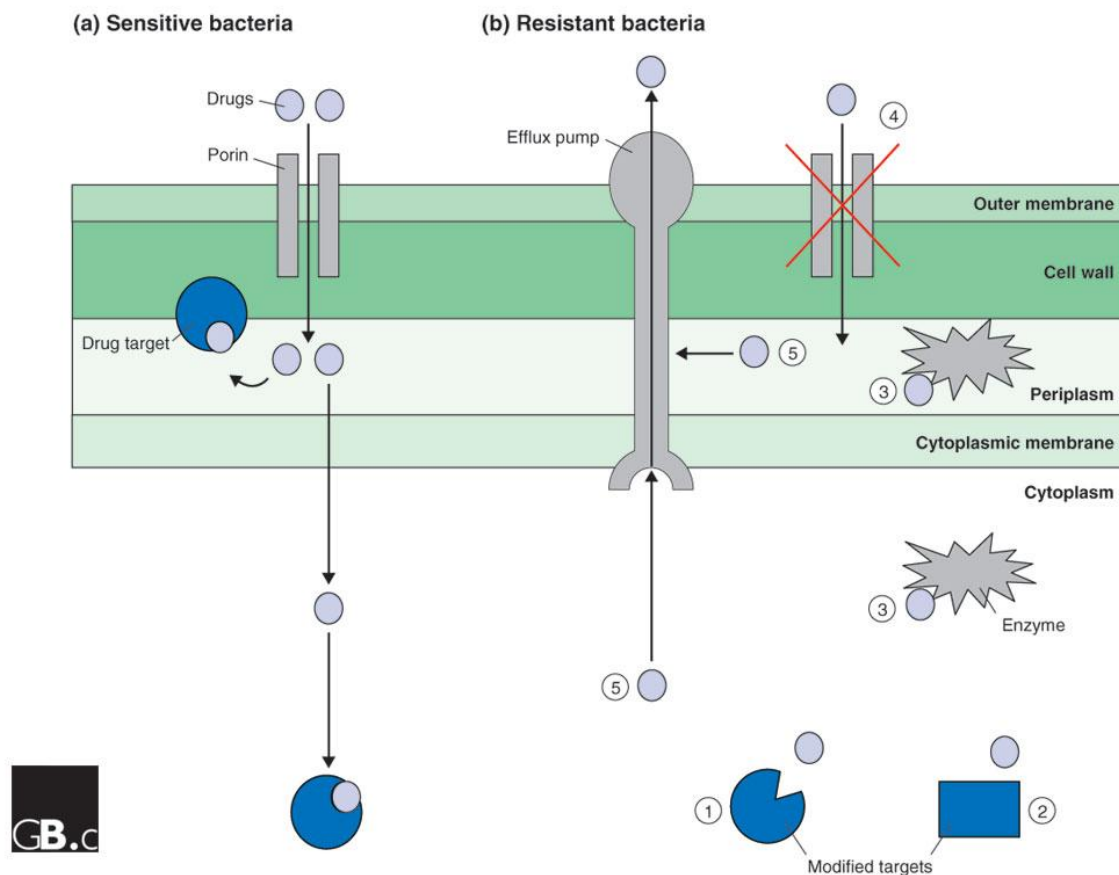


Figure 9 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif. D'après (Avison 2005)

- (a) **Bactérie sensible** : les antibiotiques pénètrent dans la bactérie par exemple à travers les protéines situées sur la membrane externe avant de se fixer sur leur cible périplasmique ou intracytoplasmique.
- (b) **Bactérie résistante** : différents mécanismes possibles :
- (1) et (2) modifications de la cible
 - (3) inactivation enzymatique (les β -lactamases sont périplasmiques).
 - (4) imperméabilité : altération des protéines de membrane externe
 - (5) efflux actif

ii) Mécanismes de résistance naturelle décrits chez *A. xylosoxidans*

Les 4 grands types de mécanismes de résistance développés chez les bactéries sont l'inactivation de l'antibiotique, l'imperméabilité, l'efflux, et la modification de la cible de l'antibiotique (Figure 9). Les mécanismes de résistance naturelle chez *A. xylosoxidans* ont été très peu explorés jusqu'à présent. Les seuls types de mécanismes décrits à ce jour sont l'inactivation par la production d'une β -lactamase constitutive et l'efflux actif.

✓ β -lactamase constitutive

La production de β -lactamases par les bactéries entraîne une inactivation de molécules de la famille des β -lactamines. En fonction de leur structure et de leur profil de substrat, Ambler a classé ces enzymes en 4 groupes (Ambler 1980; Jaurin and Grundstrom 1981; Ouellette *et al.* 1987) :

A : pénicillinases, B : métallo- β -lactamases, C : céphalosporinases, D : oxacillinases

Devant le phénotype sauvage d'*A. xylosoxidans*, plusieurs équipes ont suggéré la production de β -lactamases de type céphalosporinase (Levesque *et al.* 1983; Philippon *et al.* 1990). A l'heure actuelle, seule une β -lactamase a été caractérisée au niveau génétique et enzymatique. Il s'agit de l'oxacillinase constitutive OXA-114 décrite par l'équipe de Doi et al en 2008 (Doi *et al.* 2008). Cette β -lactamase de classe D est chromosomique et proche de l'enzyme constitutive de classe D décrite chez *Burkholderia cenocepacia*. Cette enzyme présente une activité hydrolytique efficace de la pipéracilline, la céfalotine et la ticarcilline. La ceftazidime, la céfoxitine et le céfépime ne sont pas hydrolysés. En revanche une activité hydrolytique de l'imipénème a été détectée. OXA-114 n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ni par le tazobactam et n'est pas inductible par la céfoxitine ou l'imipénème.

Ce spectre d'inactivation enzymatique ne correspond pas au phénotype de résistance naturelle aux β -lactamines observé chez *A. xylosoxidans*. Il est donc probable que cette enzyme ne soit que très peu exprimée. L'équipe de Doi a décrit OXA-114a dans la souche de référence CIP 69598 ainsi que 5 variants dans des souches cliniques (Doi *et al.* 2008).

En 2011, l'équipe de Turton a mis en évidence d'autres variants d'OXA-114 (OXA-114b à OXA-114g) (Turton *et al.* 2011). Les séquences protéiques ne diffèrent entre elles que de quelques acides aminés (au maximum 4) et les substitutions ne sont pas présentes au niveau du site actif ou des régions conservées des oxacillinases (Sanschagrin *et al.* 1995).

✓ Systèmes d'efflux actif

Il s'agit d'un mécanisme de protection cellulaire impliquant des pompes membranaires qui reconnaissent et expulsent des composés toxiques pour la cellule. Les mécanismes d'efflux et d'imperméabilité sont fréquemment retrouvés chez les bacilles à Gram négatif non fermentants. Un système d'efflux prend en charge généralement des molécules appartenant à différentes familles d'antibiotiques.

Chez *A. xylosoxidans* à l'heure actuelle, seules 2 pompes d'efflux ont été décrites : AxyABM et AxyXY-OprZ. Ces 2 systèmes décrits dans notre laboratoire (Annexe 10) sont de type RND (Résistance Nodulation and cell Division).

- AxyABM

Il s'agit d'un analogue du système d'efflux MexAB-OprM présent chez *P. aeruginosa*. Il participe à la résistance naturelle à l'aztréonam et au céfotaxime et est également capable de prendre en charge des quinolones (entre autres la ciprofloxacine) et la ceftazidime (Bador *et al.* 2011).

-**AxyXY-OprZ** est quant à lui, un analogue de MexXY retrouvé chez *P. aeruginosa* et est responsable de la résistance naturelle à l'ensemble des aminoglycosides. Il est aussi capable de prendre en charge les carbapénèmes et le céfépime (Bador *et al.* 2013).

iii) Mécanismes de résistances acquises décrites chez *A. xylosoxidans*

Ces descriptions sont très rares jusqu'alors et elles ne font état que de mécanismes de résistance par production de β -lactamases acquises.

Différentes enzymes ont été caractérisées :

- des carbénicillinases comme PSE-1 (Decre *et al.* 1995) conférant la résistance aux uréidopénicillines,
- des métallo- β -lactamases telles que VIM-1 (Riccio *et al.* 2001), VIM-2 (Sofianou *et al.* 2005), IMP-1 (Shibata *et al.* 2003; Yamamoto *et al.* 2012), IMP-10 (Iyobe *et al.* 2002) ; IMP-19 (Yamamoto *et al.* 2012) ou TMB-1 (El Salabi *et al.* 2012) conférant une résistance de haut niveau aux carbapénèmes et à la ceftazidime,
- et enfin une β -lactamase à spectre élargi (BLSE) de type VEB-1 (Neuwirth *et al.* 2006) conférant une résistance de haut niveau à la ceftazidime chez une souche isolée chez un patient atteint de mucoviscidose à Dijon.

En dehors de la BLSE, il n'est précisé pour aucune des autres enzymes si elles ont été détectées dans des souches de patients atteints ou non de mucoviscidose.

e. Pouvoir pathogène et virulence

i) Impact clinique

✓ Infections chez les immunodéprimés ou infections liées aux soins

En 1981, dans International Journal of Systematic Bacteriology, Yabuuchi et Yano décrivent *A. xylosoxidans* comme un agent pathogène opportuniste retrouvé dans divers prélèvements pathologiques (sang, liquide céphalo-rachidien, liquide pleural, liquide péritonéal, urines, selles, pus d'oreille, pharynx, yeux et pus divers).

Le caractère « pathogène » de cette bactérie reste controversé. Toutefois il a été montré qu'*A. xylosoxidans* était responsable d'infections nosocomiales chez les malades immunodéprimés (Cheron *et al.* 1994), ou les nouveau-nés (Vu-Thien *et al.* 1998; Turel *et al.* 2013). Différentes études ont décrit *A. xylosoxidans* dans des bactériémies (Duggan *et al.* 1996; Aisenberg *et al.* 2004), pneumopathies (Cheron *et al.* 1994) ou infections urinaires (Tena *et al.* 2008). Des cas de méningites (D'Amato *et al.* 1988; Decre *et al.* 1992; Fujioka *et al.* 2008) et d'endocardites ont également été rapportés (Decre *et al.* 1992; Van Hal *et al.* 2008) ainsi que des otites chroniques purulentes (Wintermeyer and Nahata 1996), kératites (Ahmed and Pineda 2011), des endophtalmies post-opératoires (Swart *et al.* 1999), et des ostéomyélites (Barton and Hoddy 1993; Ozer *et al.* 2012).

Cette bactérie est retrouvée également dans des infections liées aux soins chez les patients immunocompétents, suite à une contamination d'un produit de contraste (Reina *et al.* 1988).

✓ Dans la mucoviscidose

L'impact clinique chez les patients atteints de mucoviscidose est controversé et difficile à évaluer du fait de fréquentes co-infections avec d'autres bactéries comme *P. aeruginosa*. Les seules études disponibles se sont intéressées aux colonisations chroniques, avec des définitions variables de la chronicité (ou persistance) selon les articles. La notion de 3 cultures positives est présente partout, mais la période considérée comme significative est variable (de 6 mois à 2 ans).

D'après le registre européen de la mucoviscidose (European Cystic Fibrosis Society Patient Registry, ECFSPR), la définition de la chronicité (appliquée à toute bactérie) est encore différente :

Un patient est considéré comme chroniquement colonisé s'il remplit les conditions suivantes :

- a. >50% des prélèvements d'expectorations réalisés les 12 derniers mois sont positifs. Au minimum 4 prélèvements doivent avoir été réalisés pendant cette période.
- b. et/ou une augmentation significative du taux d'anticorps spécifiques de la bactérie est observée.

Les études les plus anciennes ont montré que la présence d'*A. xylosoxidans* était corrélée à des phases d'exacerbations aiguës (Dunne and Maisch 1995; Moissenet *et al.* 1997). Cependant ces études ne sont pas des études « cas-témoin », et la plupart des patients inclus étaient co-infectés par *P. aeruginosa* (les 6 patients dans l'étude de Dunne et 6 des 8 de l'étude de Moissenet). Le décès d'un de ces patients ne peut donc pas être attribué de façon certaine à *A. xylosoxidans*.

En 2003 dans une lettre, Romano et al (Romano *et al.* 2003) rapportent 2 cas d'infections à *A. xylosoxidans* (isolé seul), avec une détérioration importante de la fonction respiratoire. Peu de détails sont donnés malheureusement.

La première étude cas-témoin réalisée entre 1992 et 1999 dans un centre au Royaume-Uni regroupant 557 patients n'a pas montré d'impact clinique chez les 13 patients colonisés de façon persistante par *A. xylosoxidans* (Tan *et al.* 2002). Dans cette étude, les patients présentant au moins 3 cultures positives sur une période de 6 mois étaient appariés à des patients témoins en fonction de l'âge, du sexe, de la fonction respiratoire (FEV₁=Forced Expiratory Volume in 1 second ou Volume expiratoire forcé en 1 seconde) et de la colonisation par *P. aeruginosa*. Les statuts nutritionnels, respiratoires, les traitements antibiotiques et par corticoïdes ont été comparés 2 ans avant l'infection et 2 ans après l'infection, sans montrer de différences significative pour les paramètres retenus.

Une autre étude cas-témoin (Hansen *et al.* 2006) menée sur 15 patients chroniquement colonisés depuis au moins 3 ans appariés suivant l'âge, le sexe, la FEV₁, et le z-score de l'IMC (indice de masse corporelle) présente des résultats intéressants. Cette étude danoise a repris les données clinico-biologiques des patients sur une période débutant 3 ans avant la première culture positive et se terminant en 2006 (durée de suivi de 3 à 11 ans selon les patients). Elle a montré une corrélation entre des taux sériques élevés d'anticorps dirigés contre *A. xylosoxidans* et un déclin plus rapide de la fonction respiratoire. Cette observation a

été faite chez 6 patients colonisés par une même souche clonale (la souche DES), ainsi que chez 4 autres patients hébergeant d'autres clones. Les auteurs suggèrent que ces différences entre les patients à fort taux d'anticorps et les autres s'expliquent soit par des souches plus virulentes, soit par une réaction immunitaire naturellement plus développée chez ces patients. Les auteurs concluent que les infections chroniques par *A. xylosoxidans* peuvent avoir un impact clinique important, en particulier avec certaines souches épidémiques pour lesquelles les plus forts taux d'anticorps sériques sont mesurés, comme cela est déjà décrit pour *P. aeruginosa* (Hoiby *et al.* 1977; Johansen *et al.* 2004).

Une 3^e étude (De Baets *et al.* 2007) a comparé des paramètres de la fonction respiratoire de 8 patients colonisés par *A. xylosoxidans* appariés à des patients témoins par âge, sexe, et colonisation par *P. aeruginosa*. Les patients colonisés (3 cultures positives sur au moins 9 mois) n'ont pas présenté de déclin plus important de la fonction respiratoire par rapport aux cas témoins. Cependant le recours aux antibiothérapies intraveineuses était plus important.

Comme cela est déjà décrit pour d'autres agents pathogènes émergents dans la mucoviscidose (*S. maltophilia*, *B. cepacia* complex), il est difficile de savoir si la colonisation par *A. xylosoxidans* est délétère pour la fonction respiratoire, ou si cette colonisation n'est que le reflet d'une dégradation de la fonction respiratoire et du système immunitaire à un stade avancé de la maladie.

Récemment un cas de *bronchiolitis obliterans* a été rapporté chez un jeune patient atteint de mucoviscidose après une greffe de foie (De Baets *et al.*, 2013). Seule une souche d'*A. xylosoxidans* multirésistante a été isolée des prélèvements. Pour les auteurs, ce cas souligne le pouvoir pathogène potentiel d'*A. xylosoxidans* dans les infections pulmonaires, d'autant plus si le patient est sous traitement immunosuppresseur.

L'ensemble de ces études ne permet pas de conclure sur les conséquences de la colonisation par *A. xylosoxidans* dans la mucoviscidose (Hansen *et al.* 2006; De Baets *et al.* 2007). Elles ne portent que sur peu de cas avec peu de patients témoins (De Baets *et al.* 2007).

Enfin une récente étude parue en 2010 a mis en évidence chez des patients chroniquement colonisés que le niveau d'inflammation observé chez ces patients est similaire à celui observé avec *P. aeruginosa* (Hansen *et al.* 2010). Le but de l'étude était de comparer les

concentrations de marqueurs de l'inflammation dans le sérum, les expectorations et les condensats d'air exhalé (exhaled breath condensate) chez des patients chroniquement colonisés par *P. aeruginosa*, *B. cepacia* complex ou *A. xylosoxidans*. Les résultats montrent des taux de cytokines pro-inflammatoires (G-CSF) significativement plus élevés que chez les patients non colonisés par ces bactéries ainsi qu'une dégradation de la fonction respiratoire (FEV₁) comparables aux infections par *P. aeruginosa* sur la période d'étude de 2 ans.

ii) Virulence

La virulence des souches d'*A. xylosoxidans* a été très peu explorée jusqu'à présent. Aucun modèle animal d'infection respiratoire à *A. xylosoxidans* n'a été décrit à ce jour.

Les facteurs de virulence évoqués pour l'heure chez *A. xylosoxidans* sont le lipopolysaccharide (LPS) comme chez tous les bacilles à Gram négatif, une ou plusieurs cytotoxines, la capacité à former des biofilms, et la capacité de croissance en anaérobiose. Très récemment, le séquençage et l'annotation du génome complet d'une souche d'*A. xylosoxidans*, la souche NH44784-1996 (Jakobsen *et al.* 2013) a permis de comparer les gènes codants pour des facteurs de virulence dans le génome d'*A. xylosoxidans* avec ceux connus chez *P. aeruginosa* (souche PAO1).

✓ lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS, qui est un composant de la paroi des bacilles à Gram négatif, est un facteur de virulence appelé aussi endotoxine. Dans une étude il a été montré pour une souche que le LPS d'*A. xylosoxidans* induisait *in vitro* une réponse pro-inflammatoire avec la synthèse d'IL-6 ; d'IL-8 et TNF (Hutchison *et al.* 2000).

✓ Facteur cytotoxique

En 2012, une étude a montré qu'*A. xylosoxidans* était capable de provoquer *in vitro* une altération des cellules pouvant aboutir à une cytolysse ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8). Les auteurs parlent d'un facteur cytotoxique indépendant du LPS produit par *A. xylosoxidans*. (Mantovani *et al.* 2012).

✓ **Biofilm**

Deux études ont rapporté la capacité d'*A. xylosoxidans* à former des biofilms *in vitro* : celle de Jakobsen pour la souche *A. xylosoxidans* NH44784-1996 (Jakobsen *et al.* 2013) et celle de Hansen qui décrit l'observation d'aggrégats de bactéries évoquant un biofilm dans les crachats d'un patient colonisé depuis plus de 7 ans par la même souche (Hansen *et al.* 2010).

Dans le génome d'*A. xylosoxidans* NH44784-1996, il est retrouvé également la présence d'un locus (*pgaABCD*) codant pour un polysaccharide impliqué dans la formation de biofilms chez *E.coli* (système d'adhésion entre cellules et cellules-surface).

✓ **Croissance en anaérobiose**

Jakobsen *et al.* ont confirmé *in vitro* que leur souche d'*A. xylosoxidans* était capable de dénitrification, c'est-à-dire d'utiliser les nitrates ou les nitrites comme accepteur final d'électron à la place de l'oxygène pour la croissance. Ceci est appuyé par la présence dans le génome de 12 gènes codant pour des systèmes de dénitrification communs avec PAO1. Ceci permet aux bactéries de survivre en anaérobiose. Cette capacité déjà décrite chez *P. aeruginosa* est un avantage pour la bactérie pour la survie dans les biofilms peu oxygénés.

✓ **Autres gènes candidats dans le génome NH44784-1996: systèmes de sécrétion de protéines**

Ces systèmes sont utilisés par les bactéries pour l'exportation de toxines ou autres protéases dans le milieu extracellulaire (pour le type 2 : (T2SS)) ou directement dans la cellule hôte (pour le type 3 (T3SS)). Cette souche d'*A. xylosoxidans* contient dans son génome une dizaine de gènes candidats homologues à des gènes codant pour des T2SS chez *P. aeruginosa*, 13 gènes codant pour des systèmes de sécrétion de type 3 homologues à ceux de PAO1, ainsi qu'une quinzaine d'autres gènes codant pour d'autres systèmes de sécrétion (de type 6 et de type 7).

Table 3

Recommended antibiotics for therapy against *S. maltophilia* and *A. xyloxydans* in patients with CF *.

Antibiotic	Route of administration	Dose (mg/kg/day)	Administrations per day	Maximum daily dose (g)	
				Oral	IV
Minocyclin	Oral	2–3	1–2	0.2	–
Doxycyclin	Oral	2–3	1	0.2	–
Sulfamethoxazol/trimetoprim	Oral, i.v.	50–100+10–20	2–4	0.48	0.48
Ceftazidime	I.v.	150–200	3	–	12.0
Meropenem	I.v.	100–150	3	–	6
Colistin **	I.v.	2–5	2–4	–	0.48
Tobramycin	I.v.	5–10	1–3	–	0.48
Ciprofloxacin	Oral, i.v.	20–30	2–3	1.5	1.2
Aztreonam	I.v.	150–250	3	–	8.0
Ticarcillin/clavulanic acid	I.v.	200–300/6–10	4–6	–	16.0 (ticar comp)
Piperacillin/tazobactam	I.v.	200–240/25–30	3–4	–	16.0 (piperacillin comp)

* These species are resistant to many antibiotics and easily become resistant to antibiotics during treatment. Susceptibility testing must therefore guide the choice of antibiotics and combination therapy is usually recommended: Aztreonam/ticarcillin/clavulanic acid combination therapy because of synergism against *S. maltophilia*. Tetracyclines should not be used in children. Tobramycin drug levels need to be measured. Drug doses may need to be adapted according to comorbidities. Always check for drug–drug interactions.

Figure 10 : Antibiotiques recommandés pour les traitements contre *S. maltophilia* et *A. xyloxydans* chez les patients atteints de mucoviscidose (Doring *et al.* 2012).

f. Traitements des infections à A. xylosoxidans dans la mucoviscidose

Il n'existe pas à l'heure actuelle de recommandations concernant la prise en charge des patients présentant une ou plusieurs cultures positives à *A. xylosoxidans*, alors que cela est plus clairement codifié pour *P. aeruginosa*. Si la nécessité de traiter en cas d'exacerbation est peu discutée, il n'existe à aucun consensus concernant les colonisations sans signes cliniques associés. En effet le caractère pathogène de cette bactérie étant encore controversé, le risque de traiter est de sélectionner des souches multi-résistantes (y compris d'autres agents pathogènes comme *P. aeruginosa*). D'un autre point de vue, comme *A. xylosoxidans* est capable de persister dans l'arbre respiratoire, il peut être intéressant comme pour *P. aeruginosa*, de traiter d'emblée les primo-colonisations afin de retarder le plus possible le passage à la chronicité.

Dans les recommandations européennes de 2012, comme pour *S. maltophilia*, seuls les antibiotiques pouvant être utilisés sont cités mais ni le cadre de leur utilisation ni les associations possibles ne sont décrites (Doring *et al.* 2012).

Les molécules proposées sont : minocycline, doxycycline, triméthoprim-sulfaméthoxazole, ceftazidime, méropénème, colistine, tobramycine, ciprofloxacine, aztréonam, ticarcilline-acide clavulanique et pipéracilline-tazobactam. Le choix doit être fait en fonction de l'antibiogramme en privilégiant les associations (Figure 10). Dans l'étude de Saiman en 2001 portant sur 94 souches, des associations d'antibiotiques ont été testées *in vitro* : ciprofloxacine + carbapénème (imipénème ou méropénème) qui étaient efficaces sur 32% des souches ou chloramphénicol + minocycline, efficaces sur 40% d'entre elles. Les résultats de cette étude ont été repris par d'autres publications comme possibilités thérapeutiques (Gibson *et al.* 2003; Waters 2012). Cependant le chloramphénicol est une molécule difficile d'utilisation en raison de sa toxicité hématologique fréquente, et la minocycline est déconseillée chez les jeunes enfants. L'association pipéracilline + tobramycine est également synergique *in vitro* (Duez *et al.* 2010) et il a été montré dans des bactériémies, que l'association pipéracilline + gentamicine était synergique (Duggan *et al.* 1996). Enfin un travail réalisé dans le cadre d'un mémoire de diplôme d'études spécialisées a montré que l'association pipéracilline + imipénème était synergique *in vitro* sur certaines souches (Wuilleme 2003).

La tobramycine inhalée pourrait être efficace dans le traitement des infections à *A. xylosoxidans* malgré la résistance naturelle que présente cette bactérie aux doses usuelles. En effet, en cas de traitement par inhalation les concentrations locales d'antibiotiques peuvent être 1000 fois plus élevées que celles obtenues par voie injectable. L'étude de Saiman (Saiman *et al.* 2001) rapporte la sensibilité des souches à la colistine et à la tobramycine testées à des concentrations mimant celles obtenues par voie inhalée (entre 100 et 200 mg/l pour la colistine et entre 4 et 256 mg/l pour la tobramycine). La colistine présentait une bonne activité avec 92% des souches de l'étude ayant une CMI < 100 mg/l et environ 40% des souches présentaient une CMI à la tobramycine inférieure à 256 mg/l. Cependant ces résultats sont à interpréter avec précaution, car les concentrations obtenues en cas d'administration par voie inhalée restent très variables d'un patient à l'autre, car elles dépendent de la fonction pulmonaire du patient ou de sa maîtrise de l'aérosolthérapie.

La ceftazidime inhalée, utilisée dans certains pays, ne peut être utilisée que hors AMM en France.

En conclusion, les stratégies de prise en charge dépendent donc des centres.

Par exemple dans 2 centres au Danemark, (Hansen *et al.* 2006), l'approche thérapeutique est la même que lors de l'isolement de *P. aeruginosa*, c'est-à-dire que les patients sont traités dès la première culture positive. Les antibiotiques alors utilisés sont la colistine inhalée associée à la prise d'amoxicilline-acide clavulanique per os pendant 3 semaines. En cas de seconde culture positive, la même cure d'antibiotiques est poursuivie pendant 3 mois. Lors du passage à la chronicité, l'antibiothérapie inhalée est instaurée en continu en fonction de l'antibiogramme, associée à des cures d'antibiothérapies intraveineuses de 2 semaines tous les 3 mois, selon les mêmes recommandations dans leurs centres que pour le traitement des infections chroniques à *P. aeruginosa*.

Dans une étude rétrospective récente, la même équipe a montré que le traitement des primocolonisations par *A. xylosoxidans* permettrait de retarder l'évolution vers la chronicité. (Wang *et al.* 2013). Les auteurs proposent un traitement par voie inhalée à base de colistine, tobramycine ou ceftazidime. Cependant il s'agit là d'une étude rétrospective et tous les patients chez lesquels l'antibiothérapie par inhalation a éradiqué *A. xylosoxidans* avaient reçu également une antibiothérapie systémique associée (qu'elle soit active ou non sur la souche d'*A. xylosoxidans* isolée). Il semble donc difficile d'émettre des conclusions sans une réelle étude prospective cas-témoin.

C. EPIDEMIOLOGIE D'*A. XYLOSOXIDANS* DANS LA MUCOVISCIDOSE

a. Histoire naturelle de la colonisation

Dans les études la colonisation par *A. xylosoxidans* peut survenir chez les patients à tout âge. En effet la prévalence est stable en fonction de l'âge, d'après les données du RFM ou de l'US CFF, contrairement à la prévalence de *P. aeruginosa* qui augmente avec l'âge (voir Figures 3 et 4, pages 16 et 17).

Comme pour d'autres pathogènes, cette colonisation peut être sporadique, intermittente ou passer à la chronicité (De Baets *et al.* 2007; Lambiase *et al.* 2011). En cas de passage à la chronicité, les études montrent bien qu'il y a persistance du même clone pendant plusieurs années dans l'arbre respiratoire (Moissenet *et al.* 1997; Kanellopoulou *et al.* 2004; Hansen *et al.* 2006; Ridderberg *et al.* 2011).

Dans la plupart des cas, les patients sont co-infectés par un ou plusieurs autres agents pathogènes, les plus fréquents étant *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia* complex, *A. fumigatus* et *S. maltophilia* (Moissenet *et al.* 1997; Kanellopoulou *et al.* 2004; Van Daele *et al.* 2005 ; Hansen *et al.* 2006; De Baets *et al.* 2007; Lambiase *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2011). Les co-infections par *P. aeruginosa* sont fréquentes mais non obligatoires (Lambiase *et al.* 2011) et tous les patients colonisés n'ont pas d'antécédents d'infections à *P. aeruginosa*.

Quelques cas de colonisation isolée par *A. xylosoxidans* sont rapportés dans la littérature : (Kanellopoulou *et al.* 2004; De Baets *et al.* 2007; Pereira *et al.* 2011), mais des exacerbations de la maladie ne sont pas nécessairement associées.

Une étude ont montré également que des colonisations simultanées par 2 clones différents sont possibles (Pereira *et al.* 2011), mais aucune n'a montré si ces co-colonisations étaient persistantes ou si une souche excluait l'autre souche au cours du temps.

Enfin une étude rapporte qu'après greffe des poumons, 2 patients s'étaient recolonisés par leur souche d'origine avant greffe (Ridderberg *et al.* 2011). Les auteurs indiquent que les sinus pourraient jouer le rôle de réservoir, comme cela est décrit pour d'autres pathogènes (Roby *et al.* 2008; Aanaes *et al.*, 2013). Certains centres recommandent un drainage chirurgical des sinus avant greffe bien que le bénéfice ne soit pas encore prouvé (Leung *et al.* 2008).

b. Prévalence et émergence dans le monde, en France et à Dijon

i) Émergence mondiale

Depuis une dizaine d'années, différents travaux montrent l'émergence d'*A. xylosoxidans* chez les patients atteints de mucoviscidose. Les données de prévalence sont difficiles à comparer entre les différentes études car les critères retenus ne sont pas toujours les mêmes (prévalence annuelle ou sur une période de plusieurs années, prise en compte de 1, 2, ou 3 cultures positives). De plus ces critères peuvent dépendre de la prise en charge des patients dans leurs centres respectifs (ex : fréquence des consultations). Même s'il existe une grande disparité entre les centres spécialisés, différentes études ainsi que les données des registres nationaux ont montré que la fréquence d'isolement de ce pathogène est en progression constante en Belgique, aux Etats-Unis, en Italie, au Danemark et en France.

Aux Etats-Unis

Dès 1998, une prévalence élevée avait été remarquée lors d'un essai de phase III pour l'utilisation de la tobramycine inhalée chez des patients ayant des antécédents d'infection à *P. aeruginosa*. En effet, 8,7% des patients étaient colonisés par *A. xylosoxidans* dans une population de 595 patients (Burns *et al.* 1998). La comparaison des données microbiologiques au sein de 2 cohortes de patients a permis de montrer que la prévalence était passée de 4,8% en 1995 (cohorte de 508 patients) à 8,6 % en 2008 (cohorte de 256 patients) (Emerson *et al.* 2010). Dans ces 2 études, il s'agissait cependant de patients sélectionnés : âgés de plus de 6 ans et antécédents de colonisation par *P. aeruginosa*.

De manière plus globale, la prévalence annuelle rapportée par l'US Cystic Fibrosis Foundation (US CFF) en 2011 parmi environ 30 000 patients est de 6,2 % alors qu'elle n'était que de 4,4% en 2001 et de 2,7 % en 1997 (Saiman and Siegel 2004).

Les données disponibles dans les autres pays montrent une grande hétérogénéité. Tout d'abord, tous les pays n'ont pas de registre national. De plus, les données collectées dans les différents registres ne sont pas harmonisées entre les pays. Les registres auxquels il est fait référence ici sont répertoriés en Annexe 3.

Table 1.1 Number of patients seen in year 2008 or in year 2009, by country.

Country	2008	2009	Estimated coverage 2009
Austria	347	352	39%
Belgium*	1087	1129	>90%
Czech Republic*	490	507	100%
Denmark*	452	451	100%
France*	5366	5640	90%
Germany*	5533	5048	90% ¹
Greece	94	92	20%
Hungary*	547	555	90%
Ireland*	1021	-	90%
Israel**	516	533	90%
Italy	529	539	14%
Latvia	30	29	>90%
Republic of Moldova*	-	41	100%
The Netherlands*	1168	1249	97%
Portugal	61	117	42%
Serbia	118	122	>90%
Slovenia	57	66	75% ²
Spain	582	740	30% ³
Sweden*	367	578	85-90% ⁴
Switzerland	173	190	24%
Total	18537	17978	

*Countries where a national CF registry is established.

** Although not officially a national registry, all centres in Israel participate in the ECFSPR, and it is considered a registry.

¹ Germany: in 2009, due to software updates, only 75% of patients already present in the registry were reported.

² Slovenia: coverage is 100% for children and 50% for adults.

³ Spain: approximate estimate, since the total number of patients is not known

⁴ Sweden: for 2008 only 3 out of 4 centres participated, hence the difference in patient numbers with 2009.

Tableau 2 : Nombre de patients recensés en 2008 et en 2009 dans les différents pays faisant partie du registre européen. ECFSPR Annual Report 2008-2009.⁹ La colonne de droite représente l'estimation du pourcentage de patients atteints de mucoviscidose recensés pour le pays.

⁹European Cystic Fibrosis Society Patient Registry L Viviani, A Zolin, HV Olesen et al, 2012.

http://www.ecfs.eu/files/webfm/webfiles/File/ecfs_registry/ECFSPR_Report0809_v32012.pdf/

Au Canada, les chiffres disponibles uniquement depuis 2011 englobent toutes les espèces du genre *Achromobacter* avec une prévalence de 3%.

En Australie, la prévalence rapportée en 2011 pour *A. xylosoxidans* était de 1,8%.

Au Brésil

Quelques études rapportent également l'émergence d'*A. xylosoxidans* chez les patients atteints de mucoviscidose. Dans la première portant sur 216 patients suivis entre 2007 et 2009 (Mantovani *et al.* 2012), 7,5% des patients ont présenté au moins une culture positive et 3,7% plus de 3 cultures positives. Dans l'étude de Pereira portant sur 179 patients suivis dans 2 centres de Rio de Janeiro, 21,8% des patients avaient eu au moins une culture positive à *A. xylosoxidans* pendant la période de l'étude (5 ans), et 12,8% étaient considérés comme chroniquement colonisés selon leurs critères (Pereira *et al.* 2011).

En Europe

L'Italie, l'Espagne, la Suisse, n'ont pas de registre national. Au Royaume-Uni, en Allemagne, en Belgique et en Irlande, il n'y a aucune donnée dans les registres concernant *A. xylosoxidans* et *S. maltophilia*.

Un registre européen a été constitué avec une vingtaine de pays participants : l'European Cystic Fibrosis Society Patient Registry (ECFSPR). Le Tableau 2 montre le nombre de patients atteints de mucoviscidose recensés dans chaque pays participant.

Les prévalences de patients colonisés par *A. xylosoxidans* ne figurent pas dans ce registre, puisque les données concernant cette bactérie ne sont recensées que dans certains pays. Quelques pays d'Europe ont néanmoins publié des études épidémiologiques confirmant l'émergence de cette bactérie.

- **En Italie**

Une étude réalisée entre 1996 et 2006 rapporte l'émergence d'*A. xylosoxidans* pour la première fois en 2004 avec une prévalence de 3,2 % (Spicuzza *et al.* 2008).

En 2011, l'étude de Lambiase portant sur 300 patients suivis dans un centre à Naples entre 2004 et 2006 rapporte que 17,5% (53 patients) des patients ont déjà eu au moins 2 cultures positives (Lambiase *et al.* 2011). Parmi ces patients, 6 ont été considérés comme chroniquement colonisés.

- **En Belgique**

Dans un centre de Belgique regroupant 140 patients, 17,9% ont eu au moins une culture positive à *A. xylosoxidans* pendant leur suivi au centre (durée moyenne de colonisation 1,5 ans). Parmi ces patients 5,3% des malades ont présenté 3 cultures positives à *A. xylosoxidans* pendant une période d'au moins 9 mois (De Baets *et al.* 2007).

- **Au Danemark**

Au Danemark (Wang *et al.* 2013), la prévalence des patients ayant eu au moins une culture positive dans 2 centres regroupant 457 patients (soit la quasi totalité des patients du pays) est passée de 5,2% en 2000 à 11,4% en 2011. Cependant une part de l'augmentation de l'incidence est probablement due à la circulation d'une souche épidémique, la souche DES (Ridderberg *et al.* 2011; Ridderberg *et al.* 2012; Wang *et al.* 2013) qui a touché 7 nouveaux patients sur 68 pendant cette période.

- **En Grèce**

Dans une étude portant sur 71 patients dans un centre en Grèce, 9 ont présenté des cultures positives à *A. xylosoxidans* soit 12,7% sur l'année 2003.

- **Au Royaume-Uni**

Dans l'étude de Tan, 2,3% des patients suivis avaient présenté plus de 3 cultures positives en 6 mois (sur un total de 557 patients suivis entre 1992 et 1999) (Tan *et al.* 2002).

Si les chiffres sont difficiles à comparer entre les pays, il apparaît néanmoins que depuis une quinzaine d'années de nombreux pays d'Europe et d'Amérique ainsi que l'Australie rapportent la colonisation de leurs patients par *A. xylosoxidans*. Les causes de cette émergence restent inconnues à l'heure actuelle.

Répartition des CRCM au sein des inter-régions en 2013 :

Source : Association « vaincre la mucoviscidose »-Marie Sponga, Assistante registre.

Inter-région ‘Grand Est’ : Reims, Nancy adultes et pédiatrie, Strasbourg adultes et pédiatrie, Besançon adultes et pédiatrie, Dijon

Inter-région ‘Ile de France’ : Necker, Robert Debré, Cochin, Suresnes, Versailles, Trousseau, Créteil

Inter-région ‘Muco Ouest’ : Angers, Rennes adultes et pédiatrie, Nantes adultes et pédiatrie, Roscoff, Tours adultes et pédiatrie, Vannes, Poitiers

Inter-région ‘MucoMed’ : Marseille adultes et pédiatrie, Nice, Montpellier, Giens

Inter-région ‘Nord-Ouest’ : Caen adultes et pédiatrie, Lille adultes et pédiatrie, Lens, Rouen adultes et pédiatrie, Le Havre, Dunkerque, Amiens, Lisieux

Inter-région ‘Sud-Est’ : Lyon adultes et pédiatrie, Grenoble adultes et pédiatrie, Clermont Ferrand adultes et pédiatrie

Inter-région ‘Sud-Ouest’ : Bordeaux adultes et pédiatrie, Toulouse adultes et pédiatrie, Limoges

La Réunion : Saint-Pierre de la Réunion et Saint-Denis de la Réunion.

Inter-région	Prévalence chez les enfants (%)	Prévalence chez les adultes (%)	Prévalence globale (%)
1	4,5	6,6	5,4
2	9,4	7,8	8,5
3	4,7	5,6	5
4	2,9	3,2	3
5	7,2	10,8	8,3
6	4,4	9,3	6,5
7	4,2	12,1	8,7
8	2,3	5,5	3,7
France	4,3	7,6	5,3

Tableau 3 : Prévalences de patients colonisés par *A. xylosoxidans* selon les inter-régions en 2011. **Source :** Association « vaincre la mucoviscidose »-Marie Sponga, Assistante registre. A la demande de l’association, les inter-régions ont été anonymisées.

ii) Emergence en France

La seule étude réalisée dans un centre français (hôpital Trousseau à Paris, centre pédiatrique) est ancienne. Elle rapporte qu'entre 1990 et 1995, la prévalence de patients colonisés de façon persistante par *A. xylosoxidans* s'élevait à 6% parmi les 120 enfants suivis (Moissenet *et al.* 1997).

En France les données de l'ONM montrent que le pourcentage de patients colonisés est passé de 2,7 à 5,3 % entre 2001 et 2011 (Figure 4). Ces prévalences sont très variables en fonction des centres avec des chiffres allant de 0,6% à 18%. Il est cependant difficile de comparer les chiffres des centres puisqu'ils ne recrutent pas tous le même nombre de patients, et qu'il existe des centres pédiatriques, des centres adultes et des centres mixtes. Les CRCM sont répartis entre 7 inter-régions et La Réunion (voir ci-contre).

A l'échelle des inter-régions, on remarque aussi de grandes disparités. En 2011, la prévalence s'étend de 3 à 8,7% (tous patients confondus), de 2,3 à 9,4% pour les enfants et de 3,2 à 12,1% pour les adultes. On observe des chiffres moyens plus élevés chez les adultes que chez les enfants (Tableau 3).

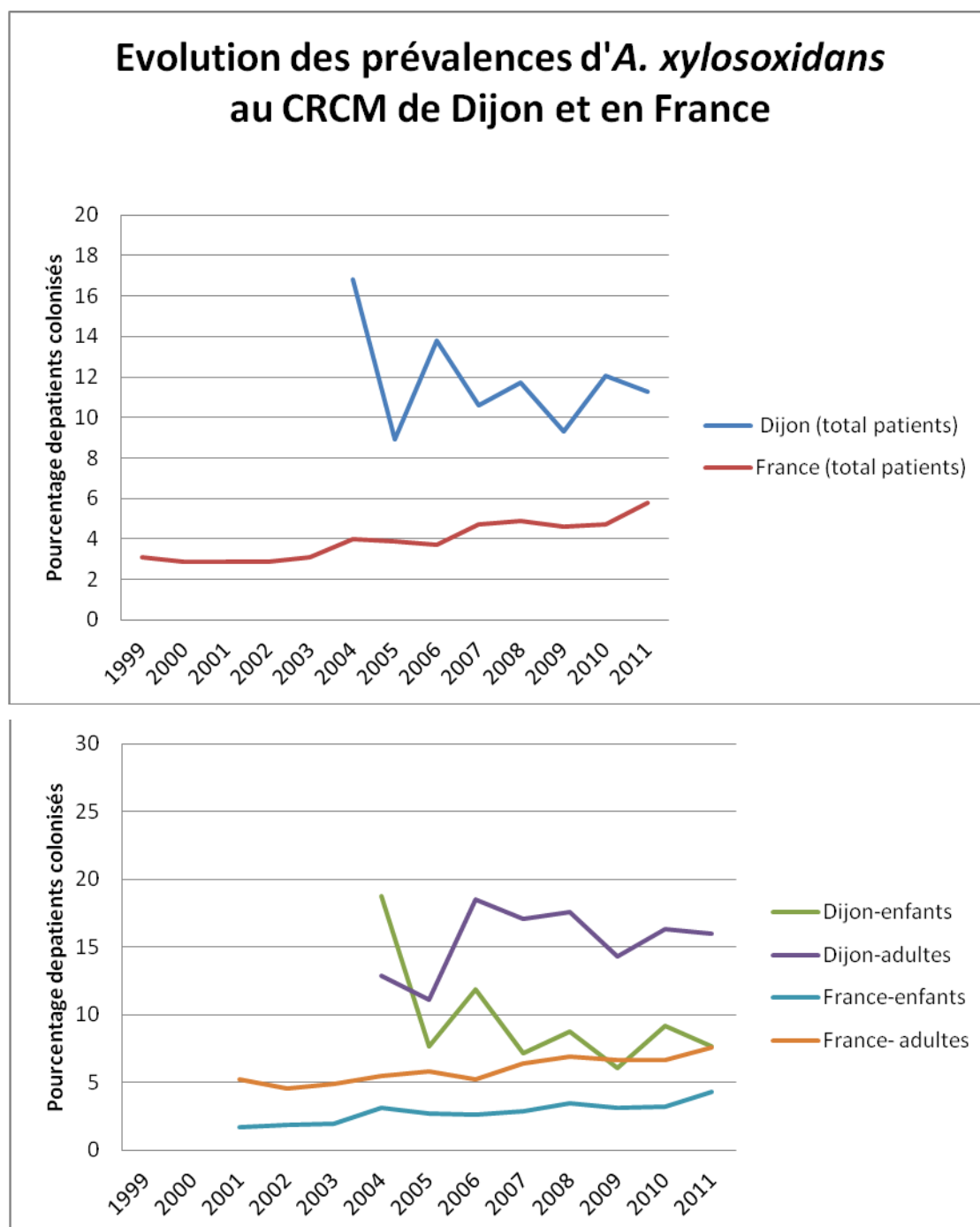


Figure 11 : Evolution des prévalences d'*A. xylosoxidans* au CRCM de Dijon et en France entre 1999 et 2011.

Graphique réalisé d'après les chiffres fournis dans les Rapports Spécifiques du CRCM de Dijon entre 2004 et 2011 et les données du Registre Français de la Mucoviscidose entre 1999 et 2011. *Source : Association Vaincre la muco.*

iii) Emergence à Dijon

Les données disponibles pour le CRCM de Dijon montrent que la prévalence est élevée depuis 2004 (17% en 2004 ; 11% en 2011) par rapport aux chiffres français (respectivement 4% et 5,7%) (Figure 11). Cette prévalence reste élevée mais relativement stable depuis 2004 autant chez les enfants que chez les adultes, alors que la prévalence globale française augmente progressivement chez les adultes et chez les enfants depuis 1999. De même que pour les chiffres français, les adultes semblent plus colonisés que les enfants. Il faut noter que la médiane d'âge de tous les patients suivis à Dijon est comparable à celle rapportée pour l'ensemble des malades en France sur la période 2004- 2011.

c. Épidémiologie de la résistance chez *A. xylosoxidans* dans la mucoviscidose

Les résistances acquises sont fréquentes parmi les souches des patients atteints de mucoviscidose principalement chez ceux qui sont chroniquement colonisés. Le pourcentage de résistance d'*A. xylosoxidans* est très élevé par rapport aux chiffres trouvés dans les souches isolées chez d'autres types de malades (Aisenberg *et al.* 2004; Siebor *et al.* 2007). Dans les études chez les immunodéprimés, la plupart des souches sont résistantes aux quinolones, mais sensibles aux pénicillines de large spectre, à la ceftazidime, à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole et à l'imipénème.

La colonisation chronique et l'exposition fréquente des patients aux antibiotiques expliquent probablement ces résistances acquises, comme cela est décrit pour *P. aeruginosa*.

Les molécules les plus étudiées sont la pipéracilline, les associations ticarcilline-acide clavulanique et pipéracilline-tazobactam, la ceftazidime, l'imipénème, le méropénème et la ciprofloxacine.

i) Résistance aux fluoroquinolones

La résistance acquise à la ciprofloxacine est fréquemment rapportée dans les études portant sur des souches isolées de patients atteints de mucoviscidose. Dans l'étude américaine de Saiman en 2001 portant sur 94 souches isolées entre 1995 et 1998 (Saiman *et al.* 2001), seules 9% d'entre elles étaient sensibles. Dans celle de Kanellopoulou en Grèce en 2004, 28 souches sur 34 étaient résistantes, les 6 souches sensibles ayant été isolées chez un seul des 9 patients (Kanellopoulou *et al.*, 2004). Une étude danoise récente (Wang *et al.* 2013) portant sur le traitement des primo-infections à *A. xylosoxidans* rapporte la sensibilité de 34 souches non isogéniques (de géotypes différents) isolées pour la première fois chez des patients atteints de mucoviscidose et identifiées comme *A. xylosoxidans* (1/3) ou *Achromobacter* sp. Parmi ces 34 souches, une seule souche était sensible à la ciprofloxacine. En 2013 dans une étude espagnole (Barrado *et al.* 2013), 7 patients sur les 10 hébergent des souches résistantes à la ciprofloxacine.

Une seule étude est un peu contradictoire. Il s'agit d'une étude italienne réalisée entre 2004 et 2008 (Lambiase *et al.* 2011) portant sur 276 souches. Seules 18 % d'entre elles étaient

résistantes à la ciprofloxacine. Il est à noter que toutes les souches de l'étude ne sont pas résistantes aux aminosides et au céfotaxime, ce qui suscite un doute sur l'identification des souches (en effet *A. xylosoxidans* est naturellement résistant à ces molécules).

ii) Résistance aux β -lactamines

Dans la littérature, la résistance acquise aux β -lactamines est fréquente chez les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose, notamment à la ceftazidime et aux carbapénèmes dans le cas de passage à la chronicité.

✓ Résistance à l'association pipéracilline-tazobactam

Globalement les pénicillines à large spectre (ticarcilline, pipéracilline, ticarcilline-acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam) sont le plus souvent efficaces contre les souches d'*A. xylosoxidans*, l'association pipéracilline-tazobactam ayant la meilleure efficacité. En effet, hormis dans une étude (Saiman *et al.* 2001) qui retrouve seulement 55% de souches sensibles, les souches étudiées sont le plus souvent sensibles. (Kanellopoulou *et al.* 2004; Lambiase *et al.* 2011; Wang *et al.* 2013). Les données concernant les autres molécules sont moins disponibles, mais l'étude de Saiman retrouvait seulement 50% de sensibilité à la pipéracilline et 40% de sensibilité à l'association ticarcilline-acide-clavulanique. De tels chiffres ne sont pas retrouvés dans d'autres publications qui rapportent peu de souches résistantes (Kanellopoulou *et al.* 2004; Lambiase *et al.* 2011).

✓ Résistance à la ceftazidime

La résistance acquise à la ceftazidime est fréquente chez *A. xylosoxidans*. Cet antibiotique est actuellement le plus actif et le plus prescrit contre *P. aeruginosa* (Lambiase *et al.* 2006). Les co-infections *P. aeruginosa* - *A. xylosoxidans* étant très fréquentes, la résistance acquise d'*A. xylosoxidans* condamne l'utilisation de la ceftazidime en monothérapie.

L'étude de 94 souches a montré que seulement 45% d'entre elles étaient sensibles à la ceftazidime (Saiman *et al.* 2001). Dans l'étude de Barrado, sur les 10 patients atteints de mucoviscidose, 5 patients colonisés chroniques hébergeaient des souches résistantes à la ceftazidime (Barrado *et al.* 2013), enfin les souches résistantes sont retrouvées chez 3 des 9 patients de l'étude de Kanellopoulou (Kanellopoulou *et al.* 2004).

Le pourcentage de résistance d'*A. xylosoxidans* à la ceftazidime est très élevé dans cette population par rapport aux chiffres trouvés pour des souches isolées chez d'autres types de malades (Aisenberg *et al.* 2004; Siebor *et al.* 2007). Il est possible que l'exposition fréquente de ces patients à la ceftazidime prescrite contre *P. aeruginosa* soit à l'origine de ces différences.

✓ Résistance aux carbapénèmes

La résistance aux carbapénèmes chez *A. xylosoxidans* n'est pas rare chez les patients atteints de mucoviscidose. Tout comme la résistance à la ceftazidime, elle pose problème en cas de co-infections avec des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes.

L'étude de Saiman en 2001 rapportait seulement 59% de sensibilité à l'imipénème et 54% au méropénème. La résistance à ces 2 molécules était présente dans les isolats de 4 patients sur les 9 de l'étude de Kanellopoulou.

Dans l'étude espagnole (Barrado *et al.* 2013), 4 patients sur 10 hébergent des souches résistantes à l'imipénème.

Cette résistance n'est pas fréquente au sein des souches isolées chez les patients immunodéprimés. De même que pour la ceftazidime, il est possible que ces résistances acquises résultent des cures répétées d'antibiothérapies chez les patients atteints de mucoviscidose.

iii) Autres antibiotiques

Peu d'études rapportent les sensibilités des souches à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole et à la colistine en raison du manque de données d'interprétation concernant ces molécules. Concernant l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole, les résultats sont d'ailleurs très variables : de 0% de sensibilité (Saiman *et al.* 2001) à plus de 80% (Lambiase *et al.*, 2011). Pour la colistine, aucune méthode de détermination de la sensibilité n'est disponible.

d. Origine de la contamination

Comme pour la plupart des agents pathogènes dans la mucoviscidose, l'origine de la contamination des patients par *A. xylosoxidans* n'est pas connue. Dans certains centres, les patients hébergent des souches de même génotype. Ceci suggère la possibilité de transmissions croisées. Il est possible également que les patients se contaminent à partir de l'environnement, comme cela est évoqué dans certaines publications.

i) Transmissions croisées chez les patients atteints de mucoviscidose

Quelques études ont montré que les transmissions croisées d'*A. xylosoxidans* entre patients en dehors des fratries étaient possibles.

Dans l'étude menée par Kanellopoulou en Grèce, (Kanellopoulou *et al.* 2004) 5 des 9 patients hébergeaient des souches de même génotype.

Dans un centre de rééducation situé en Belgique et regroupant 76 patients atteints de mucoviscidose, 13 étaient colonisés par *A. xylosoxidans* pendant leur séjour. Les souches appartenaient à seulement 4 génotypes, dont 2 prédominaient : les souches de 10 patients appartenaient au premier et les souches de 4 patients au second génotype (Van Daele *et al.* 2005). Ce centre est un établissement spécialisé accueillant des patients originaires de toute l'Europe, atteints de maladies chroniques respiratoires et en particulier de mucoviscidose, pour des séjours à vocation éducative et thérapeutique. Dans ce cas des transmissions croisées ne peuvent pas être exclues, surtout que les patients partageaient les mêmes locaux.

Dans une étude rétrospective portant sur 39 patients suivis dans un centre au Brésil (Pereira *et al.* 2011) il a été mis en évidence qu'une même souche avait colonisé 56% des patients. Dans ce cas, les auteurs évoquent la possibilité de contamination croisée des patients pendant leur visite au centre.

Au Danemark, une souche épidémique a été mise en cause dans les infections de 13 malades : 8 patients à Copenhague (Hansen *et al.* 2006) et 5 patients à Aarhus (Ridderberg *et al.* 2011; Ridderberg *et al.* 2012). Cette souche est la souche DES (Danish epidemic strain). Les auteurs évoquent la possibilité de transmissions croisées ou la présence d'une source commune.

Une étude plus récente détaille l'acquisition de cette souche par 2 patients, et ses auteurs concluent à des transmissions indirectes entre patients *via* des surfaces souillées (Hansen *et al.*, 2013). En effet les patients n'avaient pas été en contact direct avec d'autres malades porteurs de la souche épidémique mais des contacts indirects avaient été possibles dans les 2 cas puisqu'ils partageaient les mêmes locaux.

En conclusion, les transmissions croisées n'ont jamais été démontrées de façon formelle entre les patients, mais certains éléments sont très évocateurs de transmissions par contact direct ou indirect.

ii) Sources environnementales

✓ Réservoir naturel

A. xylosoxidans est souvent décrit comme un pathogène naturellement retrouvé dans l'environnement : eaux et sols, certaines équipes allant même jusqu'à affirmer que cette bactérie y est largement répandue (Siebor *et al.* 2007; Lambiase *et al.* 2011; Waters 2012; Barrado *et al.* 2013). En réalité, seules quelques souches ont été décrites dans l'environnement, et le réservoir naturel d'*A. xylosoxidans* n'est encore pas connu (Brusse and Auling 2005; Wirsing von Konig *et al.* 2011).

En 1981, dans International Journal of Systematic Bacteriology, Yabuuchi et Yano décrivent *A. xylosoxidans* comme un agent pathogène opportuniste retrouvé dans divers prélèvements pathologiques. Sa présence a déjà été également remarquée dans de l'eau distillée non stérilisée et à l'hôpital et dans des solutions de chlorhexidine (Holmes *et al.* 1977). Dans cette étude, les auteurs soupçonnaient déjà des contaminations possibles des patients à partir de l'environnement hospitalier via la colonisation de sites humides ou de l'eau distillée avec laquelle le désinfectant contaminé avait été préparé. Cette étude décrit également la présence d'une souche dans le biofilm d'une piscine d'intérieur. Aucun cas d'infection de nageurs n'avait alors été rapporté.

- à l'hôpital

Depuis, il a été montré à plusieurs reprises que l'origine des infections nosocomiales à *A. xylosoxidans* pouvait être l'eau (Reverdy *et al.* 1984), des solutions antiseptiques comme la chlorhexidine (Vu-Thien *et al.* 1998; Tena *et al.* 2005), le didécyltriméthylammonium chloride (Siebor *et al.* 2007) ou des solutions d'éosine (Boukadida *et al.* 1993). Des infections ont également été mises en évidence chez des malades non immunodéprimés suite à une contamination d'un produit de contraste (Reina *et al.* 1988).

Enfin une souche productrice de la métallo- β -lactamase TMB-1 a pu être isolée à partir de surfaces en milieu hospitalier en Libye (El Salabi *et al.* 2012).

- dans le milieu extérieur

Concernant l'environnement extra-hospitalier, les seules études décrivant la présence d'*A. xylosoxidans* sont souvent réalisées par des équipes spécialisées en microbiologie environnementale et non par des équipes de microbiologie médicale. Ces équipes s'intéressent aux bactéries capables d'éliminer les toxiques des sols ou de favoriser la croissance des plantes. Ceci a pour conséquence d'une part que les identifications ne reposent que sur le séquençage de l'ARNr16S et d'autre part que nous ne disposons d'aucune donnée concernant la sensibilité des isolats aux antibiotiques. Nous avons vu précédemment que l'identification de cette bactérie était complexe, et que la méthode de séquençage du gène *rrs* ne permet d'identifier la bactérie qu'au genre et non à l'espèce.

A l'heure actuelle, aucune étude n'a porté sur la recherche spécifique de souches environnementales d'*Achromobacter*. Des bactéries appartenant au genre *Achromobacter* identifiées par le séquençage de l'ARN 16S ont été rapportées principalement dans des sols, eaux et racines de plantes.

La présence d'*A. xylosoxidans* a ainsi été rapportée dans des études portant sur la microbiologie des sols pollués par différents toxiques comme les monochlorobiphényles (Ilori *et al.* 2008), des insecticides (Singh and Singh 2011) des hydrocarbures (Buckova *et al.* 2010), ou des métaux lourds (Ho *et al.* 2012). Ces études s'intéressent aux propriétés détoxifiantes d'*A. xylosoxidans* qui pourraient être utilisées dans les systèmes de traitement des eaux usées en association avec des plantes ou pour dépolluer certains sols.

Cette bactérie est retrouvée également dans des racines de plantes ou dans la rhizosphère (terre entourant les racines de plantes).

Isolat	Identification	Méthode	Source
<i>A. denitrificans</i> CCUG 407 ^T	<i>n.d.</i>	MLSA et MLST	sol
<i>A. ruhlandii</i> CCUG 38886 ^T	<i>A. ruhlandii</i>	MLSA et MLST	sol
<i>A. marplatensis</i> CCUG 56371 ^T	<i>A. marplatensis</i>	MLST	sol
CCUG 723	<i>A. xylosoxidans</i>	MLSA	solution antiseptique
CCUG 3353	<i>n.d.</i>	MLSA et MLST	sol pollué (dérivés chlorés)
souche <i>A. xylosoxidans</i> A8		MLST	
CCUG 14603	<i>A. xylosoxidans</i>	MLSA	eau
CCUG 27767	<i>n.d.</i>	MLSA	non renseignée
CCUG 47056 (LMG 5997)	<i>A. insolitus</i>	MLSA	lavabo de laboratoire
CCUG 52128	<i>n.d.</i>	MLSA	contrôle environnemental
NCMB 1051 (LMG 1861)	<i>A. piechaudii</i>	MLST	sol
<i>A. marplatensis</i> LMG 3439	<i>A. marplatensis</i>	MLST	désinfectant
<i>A. piechaudii</i> LMG 2828	<i>A. piechaudii</i>	MLST	Contaminant
<i>A. spanius</i> ATCC 337	<i>A. spanius</i>	MLST	lait filant
R-17672	<i>A. anxifer</i>	MLST	boue d'épuration
LMG 7054	<i>A. insuavis</i>	MLST	Piscine
LMG 11300	<i>A. aegrifaciens</i>	MLST	réservoir eau potable

Tableau 4 : Liste des souches environnementales présentes dans les banques de données identifiées par les techniques de MLSA (Ridderberg *et al.* 2012) ou MLST (Spilker *et al.* 2012) : résultat de l'identification et source.

^T : souche-type

n.d. les résultats ne permettent pas de rattacher la souche à un cluster particulier.

Généralement les auteurs recherchent spécifiquement les bactéries capables de dénitrification (Jha and Kumar 2009), ou possédant des propriétés enzymatiques particulières permettant la protection des plantes en condition de stress (Barnawal *et al.* 2012).

A. xylosoxidans a également été retrouvé en association avec des parasites de plantes (nématode du pin) (Wu *et al.* 2013).

Enfin on peut noter que la présence de souches identifiées seulement au genre *Achromobacter* sp. est rapportée dans différentes autres études dans des environnements pollués par des hydrocarbures (Farajzadeh and Karbalaei-Heidari 2012) ou des métaux : plomb (Trajanovska *et al.* 1997), arsenic (Sarkar *et al.* 2013).

Chacune de ces publications ne fait état que d'une seule souche, et il ne s'agit que d'environnements très particuliers : sols pollués par des déchets industriels ou eaux usées. Les caractéristiques biochimiques et la sensibilité aux antibiotiques des souches ne sont pas rapportées.

Les souches environnementales identifiées par les techniques de MLST ou MLSA sont encore très peu nombreuses. Dans la banque de données de l'équipe de Spilker (<http://pubmlst.org/achromobacter/>) comprenant 525 isolats à l'heure actuelle, 13 sont issus de l'environnement. L'étude de Ridderberg a quant à elle porté sur 77 isolats dont 6 issus de l'environnement (Ridderberg *et al.* 2012). De plus des souches sont communes aux deux études. Parmi ces souches environnementales, seules deux ont été identifiées comme *A. xylosoxidans* (voir Tableau 4) . Elles proviennent respectivement d'une solution antiseptique et d'une eau dont l'origine n'est pas renseignée. Parmi les autres souches environnementales identifiées par cette technique, les espèces *A. piechaudii*, *A. ruhlandii*, *A. marplatensis* et *A. anxifer* proviennent de sols ou boues d'origines non renseignée (1 souche de chaque espèce).

Les autres souches environnementales ont été isolées à partir de solutions désinfectantes contaminées, d'un lait, d'un réservoir d'eau potable, et d'une piscine (Tableau 4).

Il est par ailleurs intéressant de noter que la souche *A. xylosoxidans* A8 (CCUG 3353), isolée d'un sol pollué, n'est pas rattachée au cluster "*A. xylosoxidans*".

- environnement domestique

Dans l'environnement domestique, un cas de contamination d'un patient à partir de l'eau de son puits a été rapporté (Spear *et al.* 1988), ainsi qu'un cas d'isolement d'*A. xylosoxidans* dans de l'eau d'une piscine intérieure (Holmes *et al.* 1977).

- portage chez l'homme

Il n'existe à l'heure actuelle pas de données concernant le portage d'*A. xylosoxidans* chez l'homme.

Une étude (Qin *et al.* 2006) rapporte anecdotiquement le portage digestif d'*A. xylosoxidans* chez une petite fille de 3 mois. La souche a été isolée dans le cadre de la recherche du portage digestif de bactéries résistantes à la ciprofloxacine chez des enfants sans terrain particulier. Ni cette petite, ni son entourage n'avaient reçu d'antibiotiques dans le mois précédent.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

II-OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'émergence d'*A. xylosoxidans* chez les patients atteints de mucoviscidose est bien décrite depuis une quinzaine d'années au Danemark, en Italie, en Belgique aux Etats-Unis, au Brésil et en France. Comme pour d'autres pathogènes émergents dans la mucoviscidose, différentes hypothèses ont été émises. Ce phénomène reste néanmoins encore inexpliqué à ce jour.

Parmi ces hypothèses il faut citer :

- l'amélioration des techniques d'identification des pathogènes rares,
- la sélection de bactéries multi-résistantes par les antibiothérapies itératives avec l'allongement de l'espérance de vie des malades,
- des transmissions croisées entre patients.

En outre, les prévalences observées sont très variables d'un centre à l'autre. En France, en 2011, il existait de grandes disparités sur le territoire avec des prévalences allant de 2,3 à 9,4 % chez les enfants et de 3,2 à 12,1 % chez les adultes selon les inter-régions. Le mode ainsi que l'origine de la contamination des patients par cette bactérie ne sont pas connus à l'heure actuelle et le réservoir naturel d'*A. xylosoxidans* n'a pas encore été identifié. Dans de telles conditions l'émergence de cette bactérie n'est pas contrôlable.

Au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) de Dijon, nous avons observé une prévalence élevée de patients colonisés par *A. xylosoxidans* depuis plusieurs années avec des chiffres très supérieurs à ceux de la moyenne nationale. Nous avons observé également une augmentation de la fréquence d'isolement d'*A. xylosoxidans* dans différents prélèvements de patients hospitalisés au CHU de Dijon. Ces observations nous ont conduits à constituer une collection de souches cliniques isolées chez les patients du CRCM dès 1995 et par la suite chez d'autres types de malades hospitalisés.

Cette émergence d'*A. xylosoxidans* à Dijon est évocatrice :

- **de la diffusion épidémique de souches clonales** provenant d'une source commune ou de transmissions croisées importantes entre les patients, comme cela a été décrit dans certains centres (Pereira *et al.* 2011) ou avec d'autres bactéries comme *B. cepacia* complex (Waters 2012).

- de l'émergence de nouvelles sources de contamination environnementales :

-sélection dans l'environnement extérieur par les activités humaines : pesticides, antibiotiques, toxiques.

-sélection dans l'environnement domestique par l'usage de différents produits cosmétiques ou de nettoyage (exemple ammonium quaternaires).

Pour tenter de répondre à ces interrogations, nous avons voulu dans un premier temps décrire la situation épidémiologique dans notre centre, en tirant avantage de la collection de souches constituée au laboratoire.

Les objectifs de la première partie de ce travail étaient donc

-d'une part d'obtenir des données de génotypage et de résistance aux antibiotiques pour le suivi de l'évolution des souches chez un même patient.

- d'autre part d'obtenir des données globales pour le CRCM en termes de prévalence, de l'évaluation du risque de transmissions croisées et de l'acquisition de résistances aux antibiotiques.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux éventuelles sources de contamination des patients par *A. xylosoxidans* en Bourgogne, non seulement pour les patients atteints de mucoviscidose, mais également pour les autres malades hospitalisés au CHU de Dijon.

Les objectifs de la seconde partie de ce travail étaient donc :

- de développer une méthode d'isolement d'*A. xylosoxidans* dans différents environnements (environnement hospitalier, domestique et naturel).

- de détecter la présence de réservoirs d'*A. xylosoxidans* dans ces 3 types d'environnements.

- de mettre en évidence la circulation éventuelle de souches entre les patients et les réservoirs, par la comparaison des souches environnementales et des souches cliniques de notre collection sur le plan génotypique (par le génotypage) et phénotypique (par la description des résistances acquises).

MATERIEL ET METHODES

III-MATERIEL ET METHODES

A. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

a. Souches bactériennes

Trois types de souches ont été utilisées dans ce travail : des souches de référence ainsi que des souches cliniques et des souches environnementales isolées au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Dijon.

i) Souches de référence

Les souches de référence utilisées dans ce travail sont répertoriées dans le Tableau 5. La plupart sont issues de la Collection de l'Institut Pasteur. Il est à noter que la souche CIP 110540 (ou AXX-A) a été isolée au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Dijon dans un prélèvement d'otorrhée et son génome a été entièrement séquencé en 2010 (numéro d'accès Genbank AFRQ01000000).

Nom	Espèce bactérienne	Origine
CIP 71.32 ^T	<i>A. xylosoxidans</i>	Institut Pasteur
CIP 102236	<i>A. xylosoxidans</i>	Institut Pasteur
CIP 101902	<i>A. xylosoxidans</i>	Institut Pasteur
CIP 110540 (AXX-A)	<i>A. xylosoxidans</i>	CHU Dijon
CIP 77.26 ^T	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	Institut Pasteur
CIP 77.15 ^T	<i>Achromobacter denitrificans</i>	Institut Pasteur
CIP 108.199 ^T	<i>Achromobacter spanius</i>	Institut Pasteur
CIP 60.75 ^T	<i>Achromobacter piechaudii</i>	Institut Pasteur

Tableau 5 : Liste des souches de référence d'*Achromobacter* utilisées dans ce travail.

^T =souche type

«Une souche type est une souche qui définit une espèce, elle en est le représentant (il n'y a qu'une souche type par espèce). Une souche type est identifiée par la lettre T à la suite de son numéro d'enregistrement. » <http://www.pasteur.fr>

ii) Collection de souches cliniques du laboratoire

Cette collection regroupe d'une part toutes les souches isolées chez tous les patients atteints de mucoviscidose suivis au CRCM de Dijon depuis 1995 (total de 60 patients). Ces souches ont été isolées principalement d'expectorations. Ces prélèvements sont réalisés à une fréquence variable, selon l'état clinique du patient, environ tous les 3 mois. La collection comptait 808 souches le 28/08/13. D'autre part, cette collection de souches regroupe également des souches isolées de divers prélèvements réalisés chez des patients non atteints de mucoviscidose au cours de leur hospitalisation au CHU de Dijon (collection de 250 souches).

Pour toutes les souches de cette collection la sensibilité aux antibiotiques est connue (technique de la méthode des disques par diffusion en gélose) de même que le génotype (technique de l'électrophorèse en champ pulsé).

b. Milieux de cultures usuels et conditions de culture

- *Milieux solides* :

* Mueller-Hinton (**MH**) : Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England.

* Drigalski (**D**) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)

* Gélose au sang (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)

Toutes les cultures ont été réalisées à 37°C en atmosphère aérobie.

Les milieux utilisés spécifiquement pour l'étude environnementale seront détaillés dans la partie concernant l'étude 2 (Techniques spécifiques).

c. Identification des souches

Les souches d'*Achromobacter xylosoxidans* ont été identifiées par méthodes conventionnelles biochimiques à l'aide de galeries Api 20NE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Cette méthode a été complétée par les méthodes de séquençage du gène *rrs* codant pour l'ARNr 16S ainsi que par la spectrométrie de masse (MALDI-TOF, Bruker) lorsque les résultats obtenus avec la galerie Api 20 NE n'étaient pas satisfaisants (mauvaise discrimination ou discordance avec l'antibiogramme). Ces méthodes n'étant pas suffisamment discriminantes pour distinguer les différentes espèces d'*Achromobacter*, nous avons également séquençé le gène codant pour l'oxacillinase constitutive OXA-114. (Voir III-B).

d. Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Une colonie d'une culture de 24-48h sur MH est déposée sur une cible en métal additionnée d'une matrice. La cible est ensuite introduite dans le spectromètre de masse type MALDI-TOF (appareil Bruker). Cette matrice permet de stabiliser l'échantillon et de faciliter l'ionisation des protéines lors de l'irradiation par la source laser. Ces protéines ionisées passent alors en phase gazeuse, et vont ensuite migrer dans l'analyseur ou « tube de vol » sous l'effet d'une tension électrique.

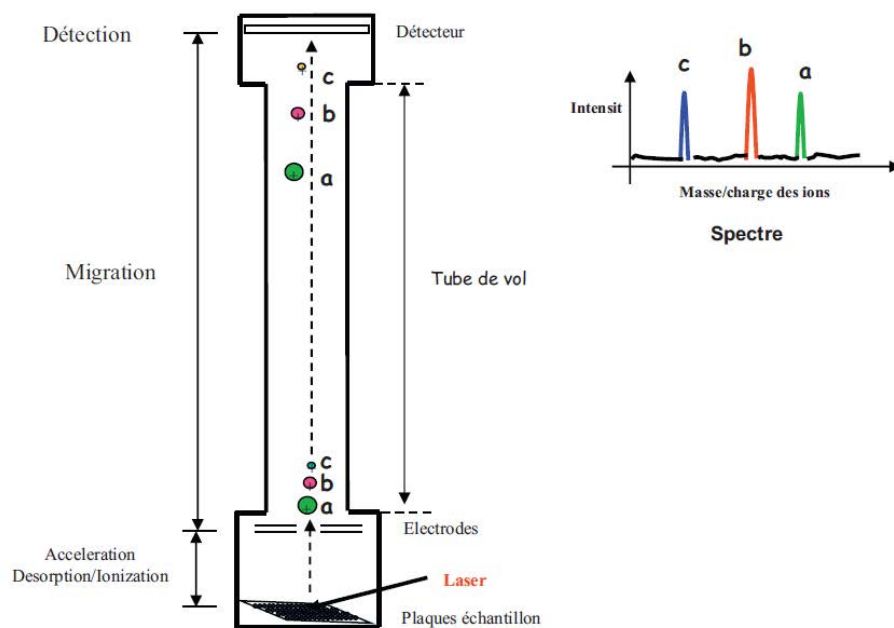


Figure 12 : Schéma explicatif de la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF. (Degand and Ruimy 2012)

Lors de cette migration, les protéines sont séparées en fonction de leur « temps de vol» (TOF, « Time of flight ») qui dépend de leur masse et de leur charge. Le détecteur permet la conversion du signal ionique en signal électrique qui est ensuite analysé par un système informatique qui réalise l'enregistrement d'un spectre (Figure 12).

Le spectre obtenu est comparé à une base de données pour déterminer l'espèce bactérienne en présence. Le bioanalyseur donne les résultats d'identification accompagnés d'un score. Bruker a déterminé des seuils pour faciliter l'interprétation des résultats. Lorsque le score est <1,7 les résultats ne sont pas fiables. Si le score est compris entre 1,7 et 2, l'identification est probable au genre. Un score > 2 permet de conclure à une identification fiable au genre et probable à l'espèce, et enfin une identification fiable à l'espèce nécessite un score > 2,3. Les souches de référence utilisées dans ce travail ont donné des scores compris entre 2 et 2,3.

La banque de données de Bruker possède actuellement les souches suivantes :

Achromobacter denitrificans DSM 11850 DSM

***Achromobacter denitrificans* DSM 30026^T DSM (CIP 77.15^T)**

Achromobacter denitrificans DSM 4612 DSM

***Achromobacter insolitus* LMG 6003^T HAM (CIP 108202^T)**

***Achromobacter piechaudii* DSM 10342^T DSM (CIP 60.75^T)**

Achromobacter piechaudii DSM 11386 DSM

***Achromobacter ruhlandii* DSM 653^T DSM (CIP77.26^T)**

Achromobacter sp DSM 30128 DSM

Achromobacter sp[3] AL908830_BK14941 UKH

Achromobacter spanius 075_W08 NFI

***Achromobacter spanius* LMG 5911^T HAM (CIP 108199^T)**

Achromobacter xylosoxidans 40 PIM

Achromobacter xylosoxidans MU_15202_1 CHB

Achromobacter xylosoxidans ssp xylosoxidans DSM 11852 DSM

***Achromobacter xylosoxidans ssp xylosoxidans* DSM 2402^T DSM (CIP 7132^T)**

Achromobacter xylosoxidans ssp xylosoxidans DSM 6388 DSM

En gras sont signalées les **souches types**.

e. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) :

-Réalisation des antibiogrammes : par inondation d'une suspension bactérienne ajustée à la concentration de 0,5 McF diluée au 1/1000°.

-Méthode des disques par diffusion en gélose : les CMI ont été extrapolées selon les recommandations du CA-SFM. Les disques utilisés sont fournis par Bio-Rad.

- Méthode par E-test : utilisation des bandelettes fournies par Biomérieux.

f. Prise en charge d'une expectoration d'un patient atteint de mucoviscidose au laboratoire en routine :

Dans le cadre du suivi systématique des patients du CRCM ou en cas d'exacerbations aiguës, des prélèvements d'expectorations sont réalisés. L'interprétation correcte des résultats bactériologiques dépend de la qualité du prélèvement qui doit permettre d'obtenir des sécrétions bronchiques. Les expectorations induites au cours d'une séance de kinésithérapie permettent d'obtenir de meilleurs résultats.

La première étape consiste à fluidifier et homogénéiser le prélèvement par l'ajout d'un mucolytique (DIGEST'EUR ®, Eurobio) aux sécrétions (volume à volume). Après une digestion pendant 15 minutes à la température du laboratoire, plusieurs géloses sont ensemencées à différentes dilutions :

- une gélose cétrimide (pur) facilitant l'isolement de *P. aeruginosa*
- une gélose Cepacia (pur) facilitant l'isolement des souches de *B. cepacia* complex
- 2 géloses Drigalski (diluées respectivement au 1/10³ et 1/10⁶) sélectives des bacilles à Gram négatif
- 2 géloses au sang incubées en aérobiose (1/10³ et 1/10⁶) (non sélectif)
- 2 géloses au sang incubées en anaérobiose (1/10³ ; 1/10⁶) (non sélectif)
- 1 gélose Chocolat incubée en atmosphère microaérophile (1/10⁶) pour l'isolement d'*H. influenzae*

Les dilutions permettent de numérer les bactéries afin de faciliter l'interprétation des résultats. L'identification (méthodes biochimiques conventionnelles) et l'antibiogramme (méthode des disques) sont réalisés sur toutes les bactéries pathogènes.

Gène cible	Couple d'amorces	Séquence (5'→3')	Taille de l'amplicon (pb)	Référence
<i>rrs</i>	P8 P1525	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1500	
<i>bla_{OXA-114 like}</i>	OXA-114A OXA-114B	ACGCCTGAACCCTTTTATCC ATCGACAGGCCGGGCAGT	1025	(Doi <i>et al.</i> 2008)
	AXXA-F AXXA-R	TGTCCAAGACCGGCAACTC ACCAGCAGGATCGACAGTC	1055	Ce travail
	OXA-114F2 OXA-114R2	CGCATCCTGTTCCAGCA GTGCCGGTCTTGCCATAC	509	(Turton <i>et al.</i> 2011)

Tableau 6 : Liste des amorces de réactions de PCR ou séquençage utilisées dans ce travail.

B. TECHNIQUES D'AMPLIFICATION GENIQUE ET SEQUENÇAGE

a. Amplification génique par PCR

Extraction de l'ADN par choc thermique (« boiling »)

Une suspension bactérienne en EPPI (Eau pour préparations injectables) est centrifugée (14000 tr/min, 5 min, 4°C). Le culot est repris dans 300 µL d'EPPI, chauffé à 100°C pendant 10 min puis refroidi 10 min dans la glace. Après une dernière centrifugation, le surnageant est conservé à -20 °C puis utilisé pour la PCR.

PCR *rrs*, *bla_{OXA}*

Les séquences des amorces utilisées (fournies par Sigma-Aldrich) sont répertoriées dans le Tableau 6.

La PCR est réalisée avec 1 µL d'ADN extrait sous un volume total de 50 µL complété avec de l'EPPI et les réactifs suivants (les concentrations finales sont indiquées entre crochets) :

- 1,25 U de Taq-polymerase (Euromedex),
- tampon Taq [1X],
- amorces [0,25 µM chacune],
- MgCl₂ [1,5 mM],
- dNTP [0,2 mM] (Roche)
- DMSO [5%] (uniquement pour l'amplification du gène codant pour OXA-114)

Le DMSO est ajouté pour faciliter la dénaturation des brins d'ADN possédant un GC% élevé chez cette espèce bactérienne.

Les conditions d'amplification sont les suivantes (thermocycleur Biometra) : 10 min à 94°C puis 30 cycles de 1 min à 94°C; 1,5 min à la température optimale d'hybridation; 1,5 min à 72°C et enfin 10 min à 72°C.

Les températures utilisées pour l'étape d'hybridation sont 56°C pour toutes les PCR hormis la PCR *rrs* (58 °C).

Les produits d'amplification sont révélés par les ultra-violets après électrophorèse en gel d'agarose à 1% (m/V) en tampon TAE (Tris-Acétate- EDTA) et coloration au bromure d'éthidium.

b. Séquençage double brin des produits de PCR

Les produits de PCR précédemment obtenus sont purifiés avec le kit Amicon Microcon PCR (Millipore) puis conservés à -20°C. Une quantification de l'ADN dans chaque tube réactionnel est ensuite réalisée à l'aide de l'appareil Nanodrop (LabTech).

Pour le séquençage sont utilisés environ 10-40 ng d'ADN, 2 µL de BigDye v1.1 contenant les dNTP, ddNTP et l'ADN polymérase (Applied Biosystems, USA), 3 µL de tampon 5X et 0,5 µL d'amorce [0,25µM] sous un volume final de 20 µL complété avec de l'EPPI. Une première dénaturation de 1 min à 96°C est suivie de 25 cycles de 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 4 min à 60°C (thermocycleur Biometra).

Les produits de séquençage sont par la suite purifiés par ajout de 1/10^e V d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 ; 1/10^e V d'EDTA 125 mM et de 2,5 V d'éthanol absolu glacé et incubation 15 min à température ambiante. Les culots de centrifugation (13000 tr/min, 15 min, 4°C) sont lavés par 70 µL d'éthanol à 70°, à nouveau centrifugés 10 min dans les mêmes conditions puis séchés à l'air. Enfin ils sont repris dans 10 µL de formamide puis conservés à -20°C avant passage dans le séquenceur ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

c. Analyse des séquences

Les séquences nucléotidiques obtenues sont ensuite analysées et comparées à celles des banques de données et entre elles à l'aide des logiciels disponibles sur internet :

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>);

CLUSTAL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

C. TECHNIQUES DE GENOYPAGE

a. *Electrophorèse en champ pulsé (ECP)*

Toutes les souches ont été génotypées par ECP selon des techniques déjà décrites (Cheron *et al.* 1994). L'ADN bactérien est extrait à partir d'une culture de 18h sur MH. Les colonies sont mises en suspension dans du tampon TE (Tris –EDTA) puis centrifugées (14000 tr/min, 5min). Le culot est de nouveau lavé dans 1ml de TE puis repris dans 2 ml TE. On ajuste ensuite la concentration bactérienne à l'aide de la mesure de Densité optique (DO) par spectrophotométrie à 650 nm (DO de 1,2 à 1,5).

La suspension est par la suite incubée dans un bain-marie à 60°C pendant 30 minutes. On ajoute ensuite 500µl de cette suspension à 500 µl de gélose bas point de fusion à 60°C (gélose SeePlake GTG FMC (Tebu) à 1% en tampon de suspension Tris-NaCl 1M). Le mélange est ensuite distribué dans une barrette à inserts (capacité de 10 inserts de 80 µl). Après refroidissement à 4°C, les inserts solidifiés sont démoulés et incubés 1 h à 37°C dans 3ml d'un tampon EDTA 0,5M pH8 dont le pouvoir complexant sur les cations aboutit à la déstabilisation du LPS et la rupture de la membrane externe. L'EDTA est ensuite remplacé par 5ml d'une solution de lyse (EDTA-0,5M pH8, SodiumDodécylSulfate 1%) ainsi que 25µl de pronase à 5000U/ml. Ceci permet l'hydrolyse des protéines bactériennes, pendant 36h à 37°C.

La digestion de l'ADN ne peut avoir lieu qu'après une étape de lavage des inserts. Deux lavages d'1h à 37°C sont réalisés sous agitation douce avec 20 ml de tampon TE et 200µl de PMSF (phénylmethylsulfonyl fluorure à 1,75%). Le PMSF permet d'inhiber les protéases présentes dans le milieu avant la digestion de l'ADN bactérien. Ensuite, les inserts sont rincés par 3 autres lavages d'1h sous agitation douce avec 20 ml de tampon TE à température ambiante. Ces lavages permettent d'éliminer le PMSF pouvant interférer avec l'enzyme de restriction. Les inserts lavés peuvent être conservés à 4°C avant utilisation.

La digestion des inserts est réalisée à l'aide de l'enzyme *XbaI*. Un insert est plongé dans 190 µl de tampon (fourni avec l'enzyme) pendant 30 minutes puis 2µL de l'enzyme *XbaI* (20000 U/ml, Biolabs) sont ajoutés. Après une nuit à 4°C, les inserts sont incubés pendant 5h à 37°C (digestion proprement dite). L'enzyme *SpeI* a été également utilisée lorsque les résultats obtenus avec *XbaI* ne permettaient pas de conclure.

Les inserts digérés sont ensuite déposés dans un gel d'agarose (1% en tampon TBE=Tris 0,05M-Borate 0,05M-EDTA 1mM, pH8). L'électrophorèse est conduite en tampon TBE pendant 20h (5,4 V/cm, et rampe de 35s-5s) à l'aide de l'appareil CHEF-DR® II (Bio-Rad). Le gel d'électrophorèse est ensuite coloré dans une solution de BET avant révélation par les ultraviolets.

Les profils de restriction obtenus sont interprétés à l'aide des critères de Tenover (Tenover *et al.* 1995) et les isolats sont classés en différents pulsotypes.

Pour les souches cliniques, nous avons attribué à chaque pulsotype retrouvé plus d'une fois un numéro (par exemple AXX1 pour *A. xylosoxidans* pulsotype 1). Les pulsotypes qui ne différaient entre eux que de 2 ou 3 fragments ont été désignés comme sous-types (par exemple AXX1A, AXX1B, AXX1C...). Enfin le pulsotype AXX0 a été attribué à tous les pulsotypes uniques, c'est-à-dire différents de tous ceux identifiés jusqu'à présent dans notre collection. Dans l'étude portant sur les souches environnementales, nous avons attribué des lettres aux différents pulsotypes retrouvés au moins une fois ainsi que l'expression « Un. », unique, pour les pulsotypes uniques.

b. Rep-PCR : technologie DiversiLab®

L'ADN des souches bactériennes est extrait grâce au kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation (MO Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) selon les recommandations du fournisseur. La concentration d'ADN extrait est estimée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 (LabTech) puis ajustée entre 25 et 50 ng/μL.

On procède ensuite à l'étape de PCR selon les instructions du fabricant en utilisant le kit DiversiLab® Bacterial Kit (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France) et la polymérase AmpliTaq® DNA Polymerase avec le tampon fourni GeneAmp® 10× PCR Buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA) dans un volume final de 25μL.

Les produits de PCR sont analysés en utilisant le kit DiversiLab® LabChip Devices (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France) sur l'appareil Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Les profils générés sont analysés par le logiciel en ligne DiversiLab[®] (version 3.4). Deux profils sont inclus dans le même « pattern » s'ils présentent moins de 2 pics de différence et plus de 95% de similarité.

Deux profils sont considérés comme distincts lorsqu'ils présentent plus de 2 pics de différence ou moins de 95% de similarité.

PREMIERE ETUDE :

A. XYLOSOXIDANS :

EPIDEMIOLOGIE AU CENTRE DE RESSOURCES ET DE COMPETENCES DE LA MUCOVISCIDOSE DE DIJON

IV-PREMIERE ETUDE :

***A. xylosoxidans* : épidémiologie au CRCM de Dijon**

A. PRESENTATION DE L'ETUDE

Les données du Registre Français de la Mucoviscidose indiquent que depuis plusieurs années la prévalence d'*A. xylosoxidans* est élevée au CRCM de Dijon, avec des chiffres supérieurs à la prévalence moyenne française. Ceci nous a conduits à étudier la situation épidémiologique à Dijon. En effet, une bonne connaissance de l'épidémiologie locale est nécessaire pour détecter d'éventuelles transmissions croisées entre les patients ou une source commune de contamination. De plus, une description détaillée de la sensibilité des souches aux antibiotiques permettra d'envisager à terme une adaptation des antibiothérapies curatives et éventuellement de prévenir l'émergence de mutants résistants.

Les objectifs de cette étude étaient d'une part de décrire sur le plan individuel les souches isolées successivement chez un même patient au cours de l'histoire de la colonisation. L'évolution des souches a été ainsi appréciée sur le génotype (génotypage), l'acquisition de résistances aux antibiotiques (antibiogrammes), et le séquençage du gène codant pour l'oxacillinase constitutive (*bla_{OXA}*). D'autre part, nous nous sommes intéressés plus globalement à la population des patients suivis au CRCM de Dijon en comparant les souches isolées chez les différents patients et en décrivant les particularités de la résistance aux antibiotiques chez *A. xylosoxidans* dans notre centre.

Une partie de cette étude rétrospective a porté sur les 120 patients suivis au CRCM de Dijon en 2010 (d'après la liste fournie par le CRCM). En effet, afin d'obtenir les données les plus représentatives de la situation épidémiologique à Dijon au moment de l'étude, nous avons pris le parti de restreindre notre investigation aux patients suivis à Dijon en 2010. Nous avons alors sélectionné ceux pour lesquels nous avons obtenu au moins une culture positive à *A. xylosoxidans* depuis le début de leur suivi dans notre centre.

PATIENT	Age de primo- colonisation	Résultat ECP (No. de sous-types)	No. de cultures positives (No. de souches)	Variant d'oxacillinase	Résistance lors de la première culture positive (année)	Résistance lors de la dernière culture positive jusqu'en 2010 (année)
P1 ^c	12	AXX42	12 ₍₁₃₎	114m	CIP (2004)	CIP, CAZ, MEM (2010)
P2 ^c	12	AXX42	12 ₍₁₃₎	114m	CIP(2004)	CIP, CAZ, MEM (2010)
P3	8	AXX61 (2)	2 ₍₂₎	243d	aucune (2001)	CIP (2010)
		AXX0	1 ₍₁₎	/	aucune (2002)	/
P4	9	AXX0	1 ₍₁₎	243c	CIP, CAZ (2010)	/
P5 ^c	16	AXX1 (3)	12 ₍₁₈₎	243b	CIP, CAZ (2003)	CAZ (2007)
P6 ^c	4	AXX1 (6)	56 ₍₇₈₎	243b	aucune (1997)	CIP, CAZ, IPM, MEM (2010)
P7	18	AXX53 (2)	5 ₍₆₎	114c	aucune (2007)	CIP (2008)
		AXX0	1 ₍₁₎	/	aucune (2007)	/
		AXX0	1 ₍₁₎	/	aucune (2008)	/
		AXX0	1 ₍₁₎	/	aucune (2010)	/
P8 ^c	18	AXX2 (6)	79 ₍₈₆₎	114h	CIP (1997)	CIP, CAZ, MEM (2010)
P9 ^c	16	AXX62 (3)	5 ₍₉₎	114e	aucune (2009)	CIP, CAZ, MEM (2010)
P10	7	AXX65	2 ₍₂₎	114i	CIP (2010)	CIP (2010)
P11	25	AXX56	4 ₍₄₎	114l	CIP(2006)	CIP, MEM (2010)
P12	8	AXX46 (3)	9 ₍₁₁₎	114g	CIP, CAZ, IPM (2005)	CIP (2010)
P13 ^c	22	AXX50	17 ₍₂₃₎	114a	CIP (2006)	CIP (2010)
		AXX55	4 ₍₄₎	114f	CIP (2008)	CIP(2008)
P14	34	AXX0	1 ₍₁₎	114k	CIP (2005)	/
		AXX47	2 ₍₂₎	/	CIP (2005)	CIP (2005)
P15	13	AXX43	15 ₍₁₈₎	114i	aucune (2004)	CIP (2006)
P16	17	AXX57	2 ₍₂₎	114f	aucune (2008)	aucune (2008)
P17	25	AXX59 (2)	8 ₍₉₎	243d	CIP, CAZ (2009)	CIP, CAZ (2010)
		AXX63	2 ₍₂₎	114c	CIP (2010)	CIP (2010)
P18	16	AXX53** (2)	3 ₍₃₎	114c	aucune (2007)	CIP (2008)
P19 ^c	25	AXX3 (8)	80 ₍₁₃₄₎	114h	CIP (1995)	CIP, CAZ, MEM (2010)
P20	4	AXX43	1 ₍₁₎	114i	CIP, CAZ (2005)	/
P21	3	AXX0	1 ₍₁₎	114a	CIP (2010)	/

Tableau 7 : Caractéristiques des 21 patients et des isolats.

C : patient chroniquement colonisé

CIP : ciprofloxacine ; CAZ : ceftazidime ; IPM : imipénème ; MEM : méropénème ; / : non déterminé

**Ce résultat diffère de celui publié dans *Journal of Cystic Fibrosis*. En effet le pulsotype AXX58 mentionné dans l'article a été réanalysé récemment et reclassé comme sous-type du pulsotype AXX53.

AXX0 : code attribué aux pulsotypes identifiés une seule fois dans notre collection.

Les pulsotypes déjà retrouvés dans des souches d'autres patients apparaissent en couleur.

Cette première partie du travail reprend donc les données de colonisation par *A. xylosoxidans* pour 21 patients désignés P1 à P21, depuis leur première visite au centre jusqu'au 31 décembre 2010 (Tableau 7).

Dans le but de mettre à jour ces données, nous avons ensuite inclus dans une seconde partie les résultats concernant les patients nouvellement colonisés entre 2011 et 2013. Il s'agit des patients P22 à P31 répertoriés dans le Tableau 10 (page 104).

Toutes les souches de cette étude font partie de la collection de souches cliniques d'*A. xylosoxidans* du laboratoire.

B. RESULTATS- DISCUSSION

Ce travail constitue la première étude rétrospective réalisée sur une longue période de suivi (jusqu'à 15 ans) dans un CRCM mixte en France.

La première partie de ce travail a inclus un total de 447 souches isolées chez 21 patients parmi les 120 suivis en 2010. Les résultats sont présentés dans les Tableaux 7 à 9 et ont fait l'objet d'une publication dans Journal of Cystic Fibrosis en 2013 (voir C).

a. Prévalence chez les patients et histoire de la colonisation

Cette étude a confirmé la prévalence élevée d'*A. xylosoxidans* parmi les 120 patients suivis à Dijon en 2010. En effet 21 d'entre eux avaient présenté au moins une culture positive à *A. xylosoxidans* depuis leur première visite au centre, soit une prévalence cumulée de 17,5%. Pour l'année 2010, *A. xylosoxidans* a pu être isolé chez 15 des 108 patients ayant eu un ECBC, soit une prévalence de 13,9%. Ce chiffre est plus élevé que la moyenne française en 2010 qui était de 4,4%. Parmi ces 15 patients, 7 étaient des enfants (< 18 ans) et 8 des adultes, soit des prévalences respectives s'élevant à 10,7% des enfants et 18,6% des adultes. Pour la France, ces chiffres étaient respectivement de 3,2% et 6,7%.

Il est possible que cette disparité importante soit le résultat de problèmes d'identification. En effet, *A. xylosoxidans* peut être facilement confondu avec d'autres BGNF et il n'est pas aisé de le repérer au sein de cultures contenant plusieurs populations de bactéries, situation la plus fréquente chez les patients (Hogardt *et al.* 2009).

Nos chiffres de prévalence cumulée sont cependant comparables à ceux observés dans d'autres centres européens : 17,9% en Belgique sur 140 patients (De Baets *et al.* 2007) ou 17,6% en Italie pour 300 patients (Lambiase *et al.* 2011).

L'âge médian lors de la primocolonisation était de 16 ans avec des extrêmes allant de 3 à 34 ans. Cette valeur est plus basse que celle retrouvée dans l'étude belge (20 ans) (De Baets *et al.* 2007). Pour comparaison l'âge médian de primocolonisation à *P. aeruginosa* varie selon les études de 4 ans (Rosenfeld *et al.* 2012) à 8 ans (Maselli *et al.* 2003) aux Etats-Unis.

La durée de colonisation était variable selon les patients : 3 patients n'avaient eu qu'une seule culture positive pendant leur suivi au centre. En revanche, 8 (6,7%) des 120 patients ont été considérés comme chroniquement colonisés selon nos critères. Nous avons repris les critères de colonisation chronique retenus par l'équipe de Pereira (Pereira *et al.* 2011) à savoir plus de 3 cultures positives par an (réalisées à au moins 1 mois d'intervalle) pendant au moins 2 ans.

Nous avons remarqué en particulier que la durée de colonisation pouvait être très longue, avec le patient P19 colonisé depuis plus de 15 ans, et les patients P6 et P8 depuis plus de 13 ans.

La durée moyenne de colonisation chez les 8 patients chroniquement colonisés était de 8 ans.

Si l'on s'intéresse à la flore microbienne retrouvée avant primocolonisation par *A. xylosoxidans*, on s'aperçoit que tous les patients avaient majoritairement présenté des cultures positives avec l'un ou plusieurs des pathogènes suivants : *S. aureus* (pour 19 patients), *P. aeruginosa* (14), *H. influenzae* (13), *S. maltophilia* (10) ou des entérobactéries (5). Nous avons remarqué que *P. aeruginosa* avait persisté dans les cultures après primocolonisation par *A. xylosoxidans* chez 5 des 14 patients.

Lors de la primocolonisation à *A. xylosoxidans*, il est intéressant de noter que tous les patients étaient co-infectés avec d'autres bactéries : le plus souvent *S. aureus* (13), *P. aeruginosa* (8), *H. influenzae* (5), *S. maltophilia* (8) ou des entérobactéries (3). Ces co-infections ont été rapportées dans de nombreuses autres études. Toutefois pour les patients P13 et P19, *A. xylosoxidans* a été le seul agent pathogène isolé dans les prélèvements respectivement 9 et 11 fois. Il serait intéressant d'obtenir des informations cliniques pour ces 2 patients, afin d'évaluer l'impact de la colonisation par *A. xylosoxidans* au cours de ces périodes.

b. Génomotypage par ECP

Les résultats de génomotypage ont montré que les 447 souches appartenaient à 24 pulsotypes.

En règle générale, chaque patient héberge sa propre souche, et celle-ci peut persister pendant de très longues périodes, jusqu'à 15 ans. Les 8 patients chroniquement colonisés ont hébergé le même clone pendant des années (plus de 13 ans pour les 3 patients P6, P8, et P19). Cette étude constitue le premier suivi au long cours de patients colonisés par *A. xylosoxidans*. Il décrit pour la première fois la persistance d'une même souche pendant de si longues périodes.

Nous avons cependant mis en évidence 4 cas de contaminations croisées dont 2 cas au sein de fratries (patients P1/P2, et P5/6) et 2 cas chez des patients non apparentés (P15/P20, et P7/P18). Les patients P15 et P20 étaient venus en consultation le même jour. Le patient P15 était un patient âgé de 14 ans colonisé depuis 1 an par la souche de pulsotype AXX43. Le patient P20 était un enfant de 4 ans chez lequel *A. xylosoxidans* n'avait jamais été isolé auparavant. Dans ce cas, il s'agit d'une transmission croisée survenue le jour de la consultation au CRCM (transmission directe *via* des aérosols en salle d'attente, ou transmission indirecte *via* des surfaces ou du matériel contaminé). La souche n'a pas persisté chez le patient P20, puisque nous n'avons jamais retrouvé d'autres cultures positives à *A. xylosoxidans* ultérieurement pour lui. Dans le dernier cas (pulsotype AXX53), la primocolonisation des patients P7 et P18 est survenue à la même période (juillet et juin 2007) alors qu'ils étaient âgés respectivement de 18 et 16 ans. Aucun contact évident n'a pu être détecté entre ces deux malades. Il est possible que l'acquisition de cette souche provienne d'une source commune qui n'a pas été identifiée (source hospitalière, extra-hospitalière ?). Chez ces 2 patients, la souche a persisté plusieurs mois dans les prélèvements.

Nous avons remarqué également que 5 patients avaient hébergé plusieurs souches de pulsotypes différents en même temps. Ceci a été décrit également dans l'étude de Pereira (Pereira *et al.* 2011). Il est intéressant de noter toutefois que la première souche isolée a persisté alors que les autres souches n'ont été isolées que sporadiquement (patients P3, P7, P13 et P17). La co-colonisation par les 2 souches a persisté moins d'1 an la plupart du temps.

PATIENT	DATE D'ISOLEMENT DE LA SOUCHE	PULSOTYPE DETERMINE PAR ECP	PATTERN DETERMINE PAR DIVERSILAB
P1	16/05/2007	AXX42	1
	10/11/2010	AXX42	2
P2	25/07/2007	AXX42	1
	26/10/2010	AXX42	2
P3	11/07/2001	AXX61A	3
	26/01/2010	AXX61B	4
P4	17/03/2010	AXX0	5
P5	23/06/2004	AXX1A	6
P6	17/06/2005	AXX1A	6
	23/07/2009	AXX1C	7
	06/12/2010	AXX1C	8
P7	21/07/2007	AXX53A	9
	27/09/2007	AXX53A	9
	15/05/2008	AXX53B	10
P8	11/09/2007	AXX2C	11
	22/11/2007	AXX2A	11
	04/06/2009	AXX2C	12
	07/09/2010	AXX2A	12
P9	03/02/2010	AXX62A	13
	27/10/2010	AXX62A	13
P10	14/09/2010	AXX65	14
	07/12/2010	AXX65	14
P11	06/03/2008	AXX56	15
	25/02/2010	AXX56	16
	06/05/2010	AXX56	16
P12	01/07/2009	AXX46A	17
	03/03/2010	AXX46B	17
P13	15/11/2007	AXX50A	18
	17/07/2008	AXX55	19
	10/11/2010	AXX50A	18
P14	04/08/2005	AXX0	20
P15	04/04/2005	AXX43	21
	30/08/2006	AXX43	21
P16	25/05/2008	AXX57	22
P17	13/01/2010	AXX63	23
	13/01/2010	AXX59A	24
	18/03/2010	AXX59A	24
	18/03/2010	AXX63	23
P19	09/01/2002	AXX3B	25
	30/11/2006	AXX3A	25
	29/04/2010	AXX3B	26
P21	27/01/2010	AXX0	27

Tableau 8 : Comparaison des techniques ECP et Diversilab® pour le génotypage de souches isolées chez 19 patients. Les discordances de résultats sont indiquées en couleur.

En conclusion, la plupart des patients hébergent leur propre souche, parfois pendant de longues périodes. Les contaminations croisées restent rares dans notre centre (à l'exception des fratries). Il n'y a donc pas de source commune de contamination. La diversité des génotypes fait ainsi évoquer une acquisition des souches à partir de l'environnement.

A l'occasion du génotypage des souches d'*A. xylosoxidans* par ECP, nous avons évalué une nouvelle technique de génotypage par rep-PCR : la technologie DiversiLab®. En effet cette technique présente l'avantage du gain de temps par rapport à l'ECP ainsi que la possibilité de créer des banques de données informatisées. Elle a fait ses preuves pour d'autres bactéries mais n'a jamais été utilisée pour le génotypage de souches d'*A. xylosoxidans*. Cette étude est donc la première à comparer cet outil de génotypage à l'ECP (technique de référence) chez *A. xylosoxidans*. De plus nous avons choisi de l'évaluer sur plusieurs souches isolées successivement chez des patients atteints de mucoviscidose (à plusieurs mois ou années d'intervalle). Le génotypage de 42 souches a donc été réalisé par DiversiLab® en parallèle de l'ECP (1 à 4 souches pour 19 des patients). Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Il s'avère qu'avec DiversiLab®, les isolats ont été classés en 27 génotypes, contrairement à l'ECP qui les a classés en 19 pulsotypes. Cette technique a permis de distinguer tous les génotypes différents retrouvés en ECP. Cependant des discordances entre les 2 techniques ont été observées principalement avec des souches isolées à plusieurs années d'intervalle chez un même patient. Ces souches pouvaient être classées dans des clusters différents avec DiversiLab® alors qu'avec l'ECP elles appartenaient au même clone. Comme déjà évoqué chez *P. aeruginosa* (Doleans-Jordheim *et al.* 2009), cette nouvelle technique de rep-PCR est donc probablement plus sensible que l'ECP aux variations mineures survenant dans le génome bactérien sur de longues périodes d'évolution.

Les résultats obtenus pour des souches isolées à moins d'un an d'intervalle étaient par contre concordants. Ceci démontre que DiversiLab® peut être utilisé pour investiguer des épidémies ponctuelles (souches isolées dans un court laps de temps). Cependant dans le cadre du suivi de patients chroniquement colonisés, l'ECP reste la méthode de référence. Chez d'autres bactéries, il a été montré que DiversiLab® pouvait être plus ou moins discriminant que l'ECP (Brolund *et al.* 2010). Nos résultats sont comparables à ceux obtenus chez *P. aeruginosa* dans l'étude de Doleans (Doleans-Jordheim *et al.* 2009).

L'ECP reste la méthode de référence pour le suivi épidémiologique des patients. L'utilisation de DiversiLab[®] peut être utile dans le cadre d'épidémies nécessitant un rendu rapide de résultats.

c. Résistance aux antibiotiques

L'étude montre que les résistances acquises aux antibiotiques sont fréquentes dans les souches des patients atteints de mucoviscidose, surtout au cours des colonisations chroniques.

Il est intéressant de noter certaines souches de primocolonisation présentaient déjà des résistances acquises, notamment à la ciprofloxacine pour 14 des 21 patients. De plus, des souches résistantes à la ceftazidime ont été isolées chez 5 patients et une souche résistante à l'imipénème chez 1 patient. L'antibiotique le plus actif dans notre étude était l'association pipéracilline-tazobactam, puisque nous n'avons détecté aucune souche résistante en 2010 ni lors du premier isolement.

Au cours de l'évolution de la colonisation, on observe une acquisition de résistances aux carbapénèmes et à la ceftazidime. Lors de la dernière culture positive, les souches de 6 patients étaient intermédiaires ou résistantes au méropénème, alors qu'aucune n'était résistante lors de la primocolonisation. Ces résistances ont toutes été observées chez des patients chroniquement colonisés (le patient P11 a présenté également des cultures positives en 2011, 2012 et 2013 avec le même génotype AXX56). De plus pour 3 de ces souches, nous avons noté un phénotype de résistance aux carbapénèmes très particulier avec des CMI de l'imipénème inférieures aux CMI du méropénème (voir Tableau 9 page 102). Ce phénotype atypique est évocateur d'une modification des PLP ou de surexpression de systèmes d'efflux dans la souche résistante. Dans un travail récent nous avons étudié le rôle d'une éventuelle surexpression des systèmes d'efflux AxyABM et AxyXY-OprZ dans la résistance acquise au méropénème dans ces souches cliniques. En effet ces deux systèmes d'efflux sont capables de prendre en charge le méropénème. Cette étude a porté sur 4 couples de souches isogéniques, sensibles / résistantes au méropénème, isolées successivement chez 4 patients (patients P1, P8, P13, et P19). Nous avons montré que le système AxyABM était constamment surexprimé dans la souche résistante par rapport à la souche sensible isogénique d'origine. (Ce travail a été réalisé en 2013 par Leslie Blondeau dans le cadre du Master 2 Recherche de la Faculté de

Médecine de Marseille intitulé « Pathologie Humaine, Maladies infectieuses et contagions, préventions »).

PATIENT	Imipénème	Méropénème
P1	3	4
P2	16	3
P6	4	4
P8	3	>32
P11	4	>32
P19	2	>32

Tableau 9 : CMI des carbapénèmes pour les souches de sensibilité diminuée isolées chez 6 patients en 2010

Les CMI (mg/l) de l'imipénème et du méropénème ont été déterminées par la méthode E-test.

Ces résultats soulignent le risque d'échec possible du méropénème sur les souches de patients atteints de mucoviscidose et remet en cause les recommandations concernant l'utilisation du méropénème dans le traitement des colonisations à *A. xylosoxidans* (Gibson *et al.* 2003; Waters 2012).

Concernant la ceftazidime, nous avons observé l'acquisition de résistances par les souches de 6 patients entre la première et la dernière culture positive. Tous ces patients étaient chroniquement colonisés. En revanche, chez 5 patients les souches étaient résistantes dès le premier isolement (P4, P5, P12, P17 et P20).

Il est probable que les traitements itératifs avec des antibiotiques ciblant en particulier *P. aeruginosa* soient à l'origine de ces résistances acquises au cours du temps. En effet, la ceftazidime et les carbapénèmes sont des molécules très utilisées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*. Cependant tous les patients hébergeant des souches résistantes n'ont pas reçu de traitements par ceftazidime ou carbapénèmes.

d. Séquençage de l'oxacillinase constitutive

Le séquençage de l'oxacillinase constitutive chez *A. xylosoxidans* a été réalisé pour au moins une souche par patient, voire davantage si les souches présentaient des phénotypes de résistance aux β -lactamines différents. Ce séquençage a été réalisé sur un total de 40 souches représentant 20 génotypes différents en ECP.

L'analyse de ces séquences a montré un polymorphisme important des oxacillinases, comme décrit dans d'autres études (Turton *et al.* 2011; Traglia *et al.* 2013). Cependant nous avons toujours retrouvé le même variant d'oxacillinase dans les souches présentant un même génotype. Nous avons détecté 5 variants déjà décrits chez *A. xylosoxidans* (OXA-114a, c, e, f, et g), et ainsi que 5 nouveaux variants : OXA-114h, i, k, l et m (numéros d'accèsion Genbank : JX206446; JX206447; JX206449; JX206450; JX206451).

Chez 4 patients nous avons retrouvé les variants d'une nouvelle oxacillinase OXA-243 qui présente 34 substitutions d'acides aminés par rapport à OXA-114 (88% d'homologie en acides aminés). Nous avons détecté chez les patients 4 variants de cette enzyme : OXA-243a, b, c, et d (numéros d'accèsion Genbank : JX206453; JX206454; JX206455 et JX206456).

L'ensemble de ces variants a été détecté aussi bien chez des souches sauvages que chez des souches présentant des résistances acquises aux β -lactamines. Les substitutions en acides aminés retrouvées dans ces variants ne sont donc pas à l'origine des résistances acquises à la ceftazidime ou aux carbapénèmes dans nos souches cliniques.

La diversité de ces oxacillinases ne reflète vraisemblablement que la diversité génétique des souches contaminant les patients, évocatrice de sources environnementales variées.

Les alignements des différents variants d'oxacillinases sont présentés en Annexe 4 pour OXA-114 et Annexe 5 pour OXA-243.

Conclusions : Cette étude constitue la première étude rétrospective avec un suivi au long cours des patients. Nous avons confirmé que la prévalence dans notre centre était élevée avec des patients colonisés pendant de très longues périodes. La variété des génotypes retrouvés a montré qu'il n'existait pas de transmissions croisées ou de source commune de contamination des patients. La fréquence des résistances acquises chez nos patients nécessite que les mécanismes soient étudiés. D'autres études en France sont nécessaires pour comparer nos résultats.

PATIENT	Age de primocolonisation	Résultat ECP	No de cultures positives (No de souches)	Résistance lors de la première culture positive (année)	Résistance lors de la dernière culture positive jusqu'en 2013 (année)
P22	39	AXX71	7(8)	CIP, TCC, CAZ, IPM, MEM, DOR (2012)	CIP, TCC, CAZ, IPM, MEM, DOR (2013)
P23	3	AXX0	1(1)	CIP (2011)	
P24	28	AXX68	2(2)	CIP (2012)	CIP, CAZ (2012)
P25	14	AXX69	4(7)	CIP (2012)	CIP, CAZ (2013)
P26	3	AXX61	1(1)	CIP (2012)	
		AXX0	1 (1)	CIP (2012)	
P27	14	AXX0	1(1)	CIP (2011)	
		AXX67	3(3)	CIP (2011)	CIP (2011)
P28	20	AXX0	1(1)	CIP (2011)	
P29	22	AXX0	1(1)	CIP (2013)	
P30	16	AXX42	1(2)	CIP, CAZ, MEM (2012)	
P31	2	AXX0	1(1)	CIP (2012)	

Tableau 10 : Caractéristiques des souches des patients P22 à P31 : géotypage et résistance aux antibiotiques.

CIP : ciprofloxacine ; CAZ : ceftazidime ; IPM : imipénème ; MEM : méropénème ; DOR : doripénème

AXX0 : code attribué aux pulsotypes identifiés une seule fois dans notre collection.

Les pulsotypes déjà retrouvés chez d'autres patients apparaissent en couleur.

Entre 2011 et 2013, nous avons pu détecter *A. xylosoxidans* dans les prélèvements de 10 patients nouvellement colonisés. Les résultats concernant ces patients sont présentés dans le Tableau 10 (Patients P22 à P31).

Concernant ces 10 nouveaux patients, on remarque en particulier que pour 7 patients, la colonisation par *A. xylosoxidans* était transitoire (le plus souvent une seule culture positive). En revanche deux patients (P22 et P25) sont colonisés depuis plus d'un an.

En ce qui concerne le génotypage, les mêmes observations qu'avec les 21 premiers patients peuvent être faites : chaque patient héberge sa propre souche. Cependant nous avons remarqué la circulation de souches dans 3 cas : 2 souches de pulsotype AXX42, et 1 souche de pulsotype AXX61. Le pulsotype AXX42 est connu chez les patients P1 et P2 (fratrie) chroniquement colonisés par *A. xylosoxidans* depuis 2004. Des souches de ce même pulsotype ont été isolées également une fois chez deux autres patients entre 2011 et 2013 : le patient P30 et le patient P8. Dans le premier cas, le patient P30 était venu en consultation le même jour que les patients P1 et P2 au CRCM, et il n'a jamais eu d'autre culture positive à *A. xylosoxidans* par la suite. Ceci évoque fortement une transmission croisée, comme dans le cas des patients P15 et P20 (transmission directe en salle d'attente ou transmission indirecte *via* des surfaces ou du matériel souillés). Le patient P8 quant à lui était hospitalisé en Néphrologie, et il n'avait pas eu de contacts avec les autres patients à notre connaissance. Ce patient est chroniquement colonisé avec une autre souche d'*A. xylosoxidans* (pulsotype AXX2) depuis 1997, et aucune autre souche du pulsotype AXX42 n'a été isolée dans les prélèvements réalisés chez lui ultérieurement. Enfin dans le dernier cas, il s'agit d'une souche de pulsotype AXX61 isolée chez le patient P3 en 2001 et en 2010 (1 seule culture positive à chaque fois), et chez le patient P26 (1 culture positive en 2012). La dissémination de cette souche est difficile à expliquer : les souches n'ont pas été isolées chez les deux patients à la même période, et ces patients ne sont pas venus le même jour en consultation. Dans ce cas il faut évoquer la possibilité d'une source commune qui aurait contaminé le patient P3 à deux reprises, et le patient P26 une seule fois jusqu'alors.

Concernant les résistances aux antibiotiques, on observe que toutes les souches des nouveaux patients sont résistantes à la ciprofloxacine dès la première culture positive. De plus le patient P22 présente une souche multi-résistante (ceftazidime et tous les carbapénèmes).

Au total si l'on s'intéresse cette fois aux 144 patients suivis en 2013, 30 ont déjà présenté au moins une culture positive à *A. xylosoxidans*, soit 20% d'entre eux, contre 17,5% en 2010.

C. TEXTE DE L'ARTICLE

Amoureux L., Bador J., Siebor E., Taillefumier N., Fanton A. and Neuwirth C.

"Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: First French data."

J Cyst Fibros **12**: 170-176. (2013).



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Original Article

Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: First French data

Lucie Amoureux^a, Julien Bador^a, Eliane Siebor^a, Nathalie Taillefumier^a,
Annlyse Fanton^b, Catherine Neuwirth^{a,*}

^a Department of Bacteriology, University Hospital of Dijon, BP 37013, 21070 Dijon Cedex, France

^b Department of Respiratory Medicine and Cystic Fibrosis Centre, University Hospital of Dijon, BP 37013, 21070 Dijon Cedex, France

Received 27 June 2012; received in revised form 30 July 2012; accepted 1 August 2012

Available online 1 September 2012

Abstract

Background: *Achromobacter xylosoxidans* is an emerging pathogen in cystic fibrosis (CF) patients recognised as causal agent of inflammation. The prevalence of infection or colonisation is variable among CF centres. We report here the first epidemiological data about *A. xylosoxidans* in a French CF centre: Dijon, Burgundy.

Methods: All isolates recovered from the patients affiliated with our centre in 2010 since their first visit were included. Antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion method and E-test. Molecular epidemiology was performed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and compared with repetitive sequence-based PCR (rep-PCR, DiversiLab®). We also sequenced the constitutive *bla*_{oxa-114} gene.

Results: Out of 120 patients, 21 (17.5%) had at least one positive culture with *A. xylosoxidans* since they started to receive routine care in our CF centre (447 isolates). Median age at first positive culture was 16 years (range 3–34 years). Most patients were colonised by their own strain, cross-contamination was very rare. We observed two cases of intra-family spread. DiversiLab® is a useful tool as efficient as PFGE to compare isolates recovered simultaneously from different patients when an outbreak is suspected. However, PFGE remains the reference method for long-term survey of chronically colonised patients. We detected new OXA-114 variants and the new oxacillinase OXA-243 (88% amino acid identity with OXA-114). Acquired resistance to ciprofloxacin, ceftazidime and carbapenems was frequent. In 2010, 7 patients harboured strains resistant to ceftazidime, 6 patients strains with decreased susceptibility to carbapenems (especially meropenem) and 12 patients strains resistant to ciprofloxacin.

Conclusions: In our centre, the high prevalence of colonisation is not due to cross-contamination. Our main concern is the high rate of antimicrobial resistance.

© 2012 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Achromobacter xylosoxidans*; Cystic fibrosis; Genotyping; DiversiLab; OXA-114; OXA-243; Resistance

1. Introduction

Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa* remain the most common pathogens isolated during airway infection in cystic fibrosis (CF) patients [1]. Nevertheless since the 2000s additional organisms have been increasingly reported: methicillin-resistant

S. aureus, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* complex and *Achromobacter xylosoxidans* [2–5]. The impact of *A. xylosoxidans* on lung disease is unclear but the recent study by Hansen suggests that it can cause inflammation in chronically infected CF patients [6].

A. xylosoxidans is an aerobic, non-fermentative, Gram-negative rod. It is frequently misidentified as *P. aeruginosa*, and therefore its prevalence is likely to be underestimated in lung colonisation/infection in CF patients [7,8].

The rate of colonisation/infection is very different among the studies, ranging from 2% in the 2000s [9] to 21% in 2011 [10].

* Corresponding author. Tel.: +33 3 80 29 32 60; fax: +33 3 80 29 36 67.
E-mail address: catherine.neuwirth@chu-dijon.fr (C. Neuwirth).

Table 1

Characteristics of the patients and isolates. C: chronically colonised patient; CIP: ciprofloxacin; CAZ: ceftazidime; IPM: imipenem; MEM: meropenem.

Patient	Age at first positive culture	PFGE pulsotype (no. of subtypes)	No. of positive cultures (no. of strains)	OXA variant	Resistance at first positive culture (year)	Resistance at last positive culture (year)
P1 ^C	12	AXX42	12 ₍₁₃₎	114m	CIP (2004)	CIP, CAZ, MEM (2010)
P2 ^C	12	AXX42	12 ₍₁₃₎	114m	CIP(2004)	CIP, CAZ, MEM (2010)
P3	8	AXX61 (2)	2 ₍₂₎	243d	None (2001)	CIP (2010)
		AXX0	1 ₍₁₎	/	None (2002)	/
P4	9	AXX0	1 ₍₁₎	243c	CIP, CAZ (2010)	/
P5 ^C	16	AXX1 (3)	12 ₍₁₈₎	243b	CIP, CAZ (2003)	CAZ (2007)
P6 ^C	4	AXX1 (6)	56 ₍₇₈₎	243b	None (1997)	CIP, CAZ, IPM, MEM (2010)
P7	18	AXX53 (2)	5 ₍₆₎	114c	None (2007)	CIP (2008)
		AXX0	1 ₍₁₎	/	None (2007)	/
		AXX0	1 ₍₁₎	/	None (2008)	/
		AXX0	1 ₍₁₎	/	None (2010)	/
P8 ^C	18	AXX2 (6)	79 ₍₈₆₎	114h	CIP (1997)	CIP, CAZ, MEM (2010)
P9 ^C	16	AXX62 (3)	5 ₍₉₎	114e	None (2009)	CIP, CAZ (2010)
P10	7	AXX65	2 ₍₂₎	114i	CIP (2010)	CIP (2010)
P11	25	AXX56	4 ₍₄₎	114 l	CIP (2006)	CIP, MEM (2010)
P12	8	AXX46 (3)	9 ₍₁₁₎	114g	CIP, CAZ,IPM (2005)	CIP (2010)
P13 ^C	22	AXX50	17 ₍₂₃₎	114a	CIP (2006)	CIP (2010)
		AXX55	4 ₍₄₎	114f	CIP (2008)	CIP(2008)
P14	34	AXX0	1 ₍₁₎	114k	CIP (2005)	/
		AXX47	2 ₍₂₎	/	CIP (2005)	CIP (2005)
P15	13	AXX43	15 ₍₁₈₎	114i	None (2004)	CIP (2006)
P16	17	AXX57	2 ₍₂₎	114f	None (2008)	None (2008)
P17	25	AXX59 (2)	8 ₍₉₎	243d	CIP, CAZ (2009)	CIP, CAZ (2010)
		AXX63	2 ₍₂₎	114c	CIP (2010)	CIP (2010)
P18	16	AXX58 (2)	3 ₍₃₎	114c	None (2007)	CIP (2008)
P19 ^C	25	AXX3 (8)	80 ₍₁₃₄₎	114h	CIP (1995)	CIP, CAZ, MEM (2010)
P20	4	AXX43	1 ₍₁₎	114i	CIP, CAZ (2005)	/
P21	3	AXX0	1 ₍₁₎	114a	CIP (2010)	/

Whatever the rate, most of the authors report an increase in prevalence of *A. xylosoxidans* in the CF population [11,12]. The reservoir of the isolates remains unknown. Most patients harbour their own strain but cross-contamination has also been described in some centres [10,13,14]. As previously described, this species is naturally resistant to cefalotin, cefoxitin, cefotaxime, aztreonam, and aminoglycosides [15,16]. OXA-114 has been described as a constitutive beta-lactamase in *A. xylosoxidans* [17]. Subsequently it has been proposed as an identification tool of this species by Turton who reported several variants of this enzyme [18].

A good knowledge of local epidemiological data is necessary to detect cross-contamination or common-source outbreak. It will be also a help to progress in the understanding of the phenomenon leading to the worldwide emergence of this pathogen.

This study is a retrospective analysis of the 120 CF patients affiliated with our centre in 2010, from their first visit to December 2010. Among them, 111 visited the centre in 2010 and sputum analysis was obtained for 108 of them.

The aim of this study was

- To perform the genotypic analysis of all isolates of *A. xylosoxidans* recovered from the patients from their first visit in our centre until the 31st of December 2010 by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and to compare the performance of the typing provided by the Diversilab® technology to that of PFGE.

- To evaluate the evolution of the antimicrobial susceptibility of the isolates.
- To detect and sequence the *bla*_{OXA-114} gene.

2. Materials and methods

2.1. Patients

One hundred and twenty patients receive care in the CF Centre of the Paediatric Department of Dijon's Hospital: the CRCM (Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose). Most patients attend regularly the centre: every three months or every month for the youngest, 111 in 2010. All bacteriological analyses are performed in our Laboratory of Bacteriology. In this study, we will use the term “colonisation” referring to a positive culture and not “infection” because we did not include any clinical data concerning the lung function of the patients. Patients were considered chronically colonised according to the criteria defined by Pereira: “when at least three positive cultures in 1 year were obtained, with a minimum 1-month interval between them, for at least 2 years” [10]. The definition was applied retrospectively to each of the colonised patients listed in Table 1.

2.2. Processing of sputum samples

The sputum are pre-treated (V/V) with Digest'EUR (Eurobio) for fluidification and then mixed vigorously to obtain

a homogenous sample. The following plates are inoculated: Cetrimide agar and *Burkholderia cepacia* selective agar (not diluted), Trypticase Soy agar with 5% sheep blood (aerobic and anaerobic conditions), Chocolate agar and Drigalski agar (after dilution).

2.3. Identification

A. xylosoxidans colonies are lactose-negative, oxidase-positive and non-pigmented on Muller–Hinton agar.

Isolates were identified as *A. xylosoxidans* by conventional methods including API 20NE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and were submitted to further identification when these conventional methods failed or in case of unusual phenotype of resistance. For this purpose we used Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spectrometry (MALDI Biotyper, Bruker) and sequencing of the whole *rrs* gene with primers P8: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and P1525: (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') [19].

2.4. Detection and sequencing of *bla*_{OXA-114-like} genes

The *bla*_{OXA-114} gene was sequenced in at least one isolate from each PFGE pulsotype recovered more than twice and in four isolates recovered only once (total of 41 strains). We used either the primer pair OXA-114A: (5'-ACGCCTGAACCCCTTTATCC-3') and OXA-114B: (5'-ATCGACAGGCCGGGCAGT-3') [17] or AXXAF: (5'-TGTCCAAGACCGGCAACTC-3') and AXXAR (5'-ACCAGCAGGATCGACAGTC-3') designed from the whole genome shotgun sequence of *A. xylosoxidans* isolate AXX-A (Genbank accession number AFRQ01000000). Positive PCR products were purified with a Millipore centrifugal filter unit (Amicon Microcon PCR kit, Millipore). Double strand sequencing was then performed using BigDye v1.1 Terminator chemistry and a 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.5. Reference strains

Reference strains *A. xylosoxidans* CIP 7132T, CIP 102062, CIP 102236, CIP 101902 and strain AXX-A were used as positive controls and *Achromobacter ruhlandii* CIP 7726T, *Achromobacter denitrificans* CIP 7715T, *Achromobacter spanius* CIP 108199T, *Achromobacter piechaudii* CIP 6075T, *Bordetella petrii* CIP 107267T, *Bordetella bronchiseptica* CIP 55110T, *Alcaligenes faecalis* CIP 6080 T were used for negative controls for PCR *bla*_{OXA-114}.

2.6. Susceptibility testing

Susceptibility testing of the isolates was performed by the disk diffusion method according to recommendations of the French Society for Microbiology (<http://www.sfm.asso.fr/>). Minimal inhibitory concentrations (MICs) of meropenem and imipenem were determined by E-test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). For each patient, we compared the susceptibility of the first isolate with the susceptibility of the last one.

2.7. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

All the strains identified as *A. xylosoxidans* in the respiratory samples of the CF patients since their first visit were submitted to genotypic analysis by PFGE as already described [20]. Isolates were analysed using restriction enzyme *Xba*I. Electrophoresis was carried out for 20 h at 5.4 V/cm, with pulse-times ranging from 5 s to 35 s using the CHEF-DR® II system (Bio-Rad). Restriction patterns were interpreted according to Tenover's criteria [21], and the isolates have been classified into different pulsotypes. The pulsotypes have been numbered (e.g. AXX1 for *A. xylosoxidans* pulsotype 1). Pulsotypes that differed by two or three fragments were considered to be subtypes (e.g. AXX1A, AXX1B, AXX1C...) according to Tenover's criteria [21]. "AXX0" was attributed to pulsotypes recovered only once and different from all those already identified to date in our hospital. Therefore all "AXX0" pulsotypes are distinct and unique.

2.8. Automated repetitive-PCR DNA fingerprinting

A total of 42 strains isolated from 19 patients were analysed by repetitive sequence-based PCR (rep-PCR; DiversiLab®) for comparison with PFGE results.

Total bacterial DNA was extracted with the UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The yield of extracted total DNA was estimated by NanoDrop® ND-1000 (LabTech.) and adjusted to approximately 25 to 50 ng/μL. Rep-PCR was performed using the DiversiLab® Bacterial Kit (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France) and AmpliTaq® DNA Polymerase with GeneAmp® 10× PCR Buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a final volume of 25 μL following the manufacturer's instructions. Rep-PCR profiles were obtained using DiversiLab® LabChip Devices (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France) and an Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Fingerprinting profiles were compared by the DiversiLab® (version 3.4) software using the Pearson correlation coefficient. The isolates were considered to belong to the same pattern when similarity was above 95% and profiles showed two or less peak changes. The isolates were classified into different patterns if similarity was less than 95% or if profiles showed more than two peak changes. One number was attributed to each pattern.

3. Results

3.1. Patients and isolates

The results are summarised in Table 1.

A total of 447 isolates identified as *A. xylosoxidans* in the respiratory samples of the CF patients were recovered. Sometimes, on culture media, different morphotypes of *A. xylosoxidans* displaying different antimicrobial susceptibility were encountered. Therefore the number of isolates (447) is higher than the number of positive cultures (339). Twenty-one out of the 120 patients affiliated with the centre in 2010 had at least one positive culture

(17.5%) since their first visit. In 2010 positive culture was obtained from 15 patients out of the 108 from whom sputum analysis was performed (13.9%).

The number of isolates per patient ranged from one (3 patients: P4, P20 and P21) to 134 over 15 years (P19). Eight patients were chronically colonised according to the criteria described above (6.7%).

A. xylosoxidans was mostly associated with other pathogens in the specimens, except for 2 patients (P13 and P19) from whom *A. xylosoxidans* was isolated alone in 9 and 11 sputum samples respectively. Associated pathogenic bacteria were mostly *S. aureus*, *H. influenzae*, *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, or *S. maltophilia* (data not shown).

Median age at first positive culture was 16 years (range: 3–34).

3.2. Genotyping analysis by PFGE

The 447 isolates recovered from the 21 patients have been submitted to genotypic analysis by PFGE. The 447 isolates belonged to 25 distinct genotypes. We have detected three cases of cross-contamination. It was an intra-familial one for patients P1 and P2 as well as for patients P5 and P6. The patients P15 and P20 who shared the genotype AXX43 were unrelated. Strains isolated successively from the same patient had the same genotype. The strains are consistent over time, even over very long periods: 13 years for P6 and P8 to 15 years for P19. Five patients harboured isolates of different genotypes: either once sporadically (patients P3, P7 and P14), or for a longer period (patients P13 and P17). Among them it is noteworthy that the newly acquired strain never replaced the initial one.

3.3. Genotyping by Diversilab® technology

Genotyping of strains of *A. xylosoxidans* by rep-PCR was performed for 42 strains isolated from 19 patients (1 to 4 isolates per patient) (Table 2).

The 42 strains were classified into 27 genotypes by Diversilab® technology and only into 19 genotypes by PFGE. All strains that belonged to different PFGE genotypes also belonged to different genotypes as determined by Diversilab®. Nevertheless strains that belonged to the same PFGE genotype were classified into different genotypes by Diversilab® for 8 patients (i.e. patients P1, P2, P3, P7, P8, P11, P13 and P19). Indeed, minor differences in the profiles determined by PFGE led to the classification of the isolates in the same pattern whereas minor variations in the profiles determined by rep-PCR led to the classification of the isolates in different patterns.

3.4. Antibiotic susceptibility

The 447 isolates of *A. xylosoxidans* included in the study displayed the innate resistance of the species to aztreonam, cefalotin, cefoxitin, cefotaxime, kanamycin, amikacin, tobramycin, gentamicin, netilmicin, nalidixic acid and ofloxacin. We report here for each patient the susceptibility of the first isolate in

Table 2

Comparison of genotyping by Diversilab® technology with PFGE on strains isolated from 19 patients.

Patient	Date of isolation	PFGE pulsotype	Diversilab pattern
P1	16/05/2007	AXX42	1
	10/11/2010	AXX42	2
P2	25/07/2007	AXX42	1
	26/10/2010	AXX42	2
P3	11/07/2001	AXX61A	3
	26/01/2010	AXX61B	4
P4	17/03/2010	AXX0	5
P5	23/06/2004	AXX1A	6
P6	17/06/2005	AXX1A	6
	23/07/2009	AXX1C	7
P7	06/12/2010	AXX1C	8
	21/07/2007	AXX53A	9
	27/09/2007	AXX53A	9
	15/05/2008	AXX53B	10
P8	11/09/2007	AXX2C	11
	22/11/2007	AXX2A	11
	04/06/2009	AXX2C	12
	07/09/2010	AXX2A	12
P9	03/02/2010	AXX62A	13
	27/10/2010	AXX62A	13
P10	14/09/2010	AXX65	14
	07/12/2010	AXX65	14
P11	06/03/2008	AXX56	15
	25/02/2010	AXX56	16
	06/05/2010	AXX56	16
P12	01/07/2009	AXX46A	17
	03/03/2010	AXX46B	17
P13	15/11/2007	AXX50A	18
	17/07/2008	AXX55	19
	10/11/2010	AXX50A	18
P14	04/08/2005	AXX0	20
P15	04/04/2005	AXX43	21
	30/08/2006	AXX43	21
P16	25/05/2008	AXX57	22
P17	13/01/2010	AXX63	23
	13/01/2010	AXX59A	24
	18/03/2010	AXX59A	24
	18/03/2010	AXX63	23
P19	09/01/2002	AXX3B	25
	30/11/2006	AXX3A	25
	29/04/2010	AXX3B	26
P21	27/01/2010	AXX0	27

comparison with the susceptibility of the last one to the following molecules: ceftazidime, piperacillin/tazobactam, imipenem, meropenem and ciprofloxacin (year of isolation indicated in Table 1). At first positive culture, the isolate was susceptible to these 5 antibiotics for 7 patients, resistant to ceftazidime for 5 patients, resistant to imipenem for 1 patient and resistant to ciprofloxacin for 16 patients. At last positive culture, isolates resistant to ceftazidime have been recovered from 7 patients. The evolution of carbapenem resistance is important mainly among strains recovered from chronically colonised patients: in 2010, 6 patients harboured strains with decreased susceptibility to meropenem (Table 3). For 3 isolates, MIC of imipenem was much lower than MIC of meropenem. Piperacillin/tazobactam was the most active molecule: no resistant strain has been detected in 2010.

3.5. Sequencing of *bla*_{OXA-114-like} gene

The entire *bla*_{OXA-114like} gene from 41 strains (20 different PFGE patterns) was sequenced.

Analysis of the sequences revealed polymorphisms. We have detected five variants (*bla*_{OXA-114 a, c, e, f, g}) already described [17,18] and five new variants (*bla*_{OXA-114 h, i, k, l, m}). (Genbank accession numbers JX206446; JX206447; JX206449; JX206450; JX206451). Moreover we have found a new oxacillinase differing from OXA-114a by 34 amino acid substitutions (88% identity). This enzyme was assigned the number OXA-243 (<http://www.lahey.org/Studies/>). A total of four variants of this enzyme were characterised in four isolates as well as in the reference strain AXX-A (*bla*_{OXA-243 a, b, c, d}). Genbank accession numbers JX206453; JX206454; JX206455; JX206456). All isolates that belonged to the same genotype harboured the same *bla*_{OXA} gene.

4. Discussion

This is the first epidemiological study about *A. xylosoxidans* in a French CF centre. Among the 120 affiliated patients, 21 had at least one positive culture since their first visit. In 2010, positive(s) culture(s) were obtained for 13.9% of the 108 patients for whom sputum analysis was performed. This percentage is much higher than the 4.4% reported in the French global data in 2010 (http://www.vaincrelamuco.org/e_upload/pdf/rapport_registre_2010.pdf). This difference might be due to misidentification in some centres as already reported [8,22]. According to our experience, many isolates of *A. xylosoxidans* share common properties with non-pigmented isolates of *P. aeruginosa*: aerobic, oxidase positive, growth at 41 °C but not at 4 °C, growth on cetrimide medium. The difficulty of identification is enhanced in case of co-culture of both species.

Such a high prevalence has already been reported in some other European centres: 17.6% (among 300 patients) in Italy [23] or 17.9% in a Belgian CF centre (among 140 patients) [22]. Nevertheless the median age at first positive culture was 16 years in our centre which is younger compared to the Belgian centre (median: 20 years). Eight of our patients (6.7%) were chronically colonised with *A. xylosoxidans*. It is a long-term colonisation, these patients being still colonised in 2011 and 2012 (except patient P5, who did not visit the centre since 2007). This rate is somewhat higher than in the Belgian centre (5.6%). Using the same criteria as De Baets (at least 3 positive cultures over at least nine months) the number of chronically colonised patients in our centre would be of 10% instead of

6.7%. To date, the highest rate of chronically colonised patients has been reported in a Brazilian centre: 12.8% [10].

The genotypic analysis by PFGE results proved that patients harboured their own strain. Thanks to the analysis of the strains isolated successively from the patients we have demonstrated that this long-term colonisation lasted over 15 years for one patient. We did not observe strain displacement. As PFGE analysis is time consuming we compared this method with the Diversilab® technology. This is the first study of this typing method for *A. xylosoxidans* strains. In all cases, isolates that were classified as unrelated by PFGE were also classified as different by Diversilab®. Nevertheless, some isolates belonging to the same PFGE pattern were classified as different by Diversilab®. Such discrepancies were already described for other bacterial species such as *Pseudomonas aeruginosa* [24]. It happened when isolates were recovered with more than 8 months interval. It seems therefore that Diversilab® is more sensitive than PFGE to minor variations of the strains over time. We conclude that PFGE remains the reference method for the survey of long-term colonisation. We propose the Diversilab® as a useful and rapid typing tool to compare isolates recovered simultaneously when an outbreak is suspected or for the comparison of clinical isolates with environmental isolates as already suggested for other pathogens [25].

The cross-contamination between patients was very uncommon in our centre except in 2 cystic fibrosis families. A cross-contamination occurred also between two unrelated patients, one colonised and one non- colonised patient visiting the centre the same day. Nevertheless, it is important to note that the non-colonised patient never happened to have *A. xylosoxidans* again in his subsequent expectorations.

Some patients were colonised with a second strain, genotypically distinct. This co-colonisation was sporadic and lasted for a short time (mostly less than one year).

This diversity of genotypes suggests that the majority of *A. xylosoxidans* isolates from CF patients probably originate from domestic environmental sources. A study of environmental samples might be a help to identify the potential source(s).

Acquired resistance to antibiotics was frequent. The first isolates recovered from our patients were mostly resistant to ciprofloxacin and the mechanism leading to this resistance has to be explored. Acquired resistance to ceftazidime and carbapenems was high among patients attending our centre, and concerned mainly chronically colonised patients.

Repeated administration of antibiotics to treat infections due to common pathogens, especially *P. aeruginosa*, might explain this selection of resistant *A. xylosoxidans*.

It is also important to note that for the first time we report an unusual phenotype in the strains resistant to carbapenems, some of them being much more resistant to meropenem than to imipenem. We recently described the efflux system AxyXY-oprZ in *A. xylosoxidans* which can extrude meropenem (submitted manuscript). The production level of this system will be explored in the clinical isolates to assess its potential contribution to meropenem resistance. Our results are not in accord with Jacquier who recently reported that meropenem displays an interesting antimicrobial activity against *A. xylosoxidans* as compared with

Table 3
MICs (mg/L) of imipenem and meropenem of isolates recovered in 2010 with decreased susceptibility to imipenem and/or meropenem. (E-test method).

Patient	Imipenem	Meropenem
P1	3	4
P2	16	3
P6	4	4
P8	3	>32
P11	4	>32
P19	2	>32

imipenem [26]. Another study conducted in Naples shows that the activity of meropenem is comparable to that of imipenem on 53 isolates [23]. The recommendations for the treatment of *A. xylosoxidans* infection in CF patients are to use intravenous combination of antibiotics including either imipenem or meropenem [27]. Therefore more data are needed to propose the most active carbapenem.

OXA-114 has been described as constitutive in *A. xylosoxidans* [17]. We have detected a wide diversity of *bla*_{OXA-114} genes as reported elsewhere [18] as well as five new variants of this enzyme. Nevertheless the primers proposed by Turton did not allow the detection of *bla*_{OXA-114} in all our isolates. This highlights the limits of the method. More interestingly we also detected the new oxacillinase OXA-243 with 3 variants. The identification of the isolates harbouring *bla*_{OXA-243} was confirmed by sequencing house-keeping genes (data not shown). This method proved to be a very discriminant tool for identification of *A. xylosoxidans*. A similar method has been published very recently [28]. We have detected the different variants of OXA-114 and OXA-243 among strains harbouring various phenotypes of antimicrobial resistance. Therefore these enzymes do not account for acquired resistance to ceftazidime or carbapenems. The diversity of oxacillinases produced by clinical strains might only reflect the diversity of *A. xylosoxidans* natural reservoirs.

5. Conclusion

This study reports for the first time the survey of colonisation of 21 patients by *A. xylosoxidans* since it was first isolated. The prevalence of *A. xylosoxidans* is high in our CF centre. Till now we observed very rare cross-contamination between patients. There is a wide diversity of the isolates and the length of colonisation is sometimes very long. Our main concern is the acquired antimicrobial resistance of the isolates, especially in chronically colonised patients. These first French data including a very large number of isolates should be compared with those of other CF centres from France.

References

- [1] Beringer PM, Appleman MD. Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. *Curr Opin Pulm Med* 2000;6: 545–50.
- [2] Millar FA, Simmonds NJ, Hodson ME. Trends in pathogens colonising the respiratory tract of adult patients with cystic fibrosis, 1985–2005. *J Cyst Fibros* 2009;8:386–91.
- [3] Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest* 2009;136:1554–60.
- [4] Sawicki GS, Rasouliyan L, Pasta DJ, Regelman WE, Wagener JS, Waltz DA, et al. The impact of incident methicillin resistant *Staphylococcus aureus* detection on pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2008;43:1117–23.
- [5] Waters V, Yau Y, Prasad S, Lu A, Atenafu E, Crandall I, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: serologic response and effect on lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;183:635–40.
- [6] Hansen CR, Pressler T, Nielsen KG, Jensen PO, Bjarnsholt T, Hoiby N. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2010;9:51–8.
- [7] Hogardt M, Ulrich J, Riehn-Kopp H, Tummeler B. EuroCareCF quality assessment of diagnostic microbiology of cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol* 2009;47:3435–8.
- [8] Kidd TJ, Ramsay KA, Hu H, Bye PT, Elkins MR, Grimwood K, et al. Low rates of *Pseudomonas aeruginosa* misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2009;47:1503–9.
- [9] Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, et al. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis* 1998;27:158–63.
- [10] Pereira RH, Carvalho-Assef AP, Albano RM, Folescu TW, Jones MC, Leao RS, et al. *Achromobacter xylosoxidans*: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2011;49:3649–51.
- [11] Emerson J, McNamara S, Buccat AM, Worrell K, Burns JL. Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr Pulmonol* 2010;45:363–70.
- [12] Ridderberg W, Bendstrup KE, Olesen HV, Jensen-Fangel S, Nørskov-Lauritsen N. Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment. *J Cyst Fibros* 2011;10:466–9.
- [13] Kanellopoulou M, Pournaras S, Iglezos H, Skarmoutsou N, Papafrangas E, Maniatis AN. Persistent colonization of nine cystic fibrosis patients with an *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* clone. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:336–9.
- [14] Van Daele S, Verhelst R, Claeys G, Verschraegen G, Franckx H, Van Simaey L, et al. Shared genotypes of *Achromobacter xylosoxidans* strains isolated from patients at a cystic fibrosis rehabilitation center. *J Clin Microbiol* 2005;43:2998–3002.
- [15] Bador J, Amoureux L, Duez JM, Drabowicz A, Siebor E, Llanes C, et al. First description of an RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;55:4912–4.
- [16] Duez JM, Hadjait-Savioz M, Siebor E, Astruc K, Bador J, Pechinot A, et al. In vitro synergistic activity of combined piperacillin and tobramycin against clinical strains of *Achromobacter xylosoxidans*. *J Chemother* 2010;22:139–41.
- [17] Doi Y, Poirel L, Paterson DL, Nordmann P. Characterization of a naturally occurring class D beta-lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1952–6.
- [18] Turton JF, Mustafa N, Shah J, Hampton CV, Pike R, Kenna DT. Identification of *Achromobacter xylosoxidans* by detection of the *bla*(OXA-114-like) gene intrinsic in this species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:408–11.
- [19] Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 1989;17: 7843–53.
- [20] Cheron M, Abachin E, Guerot E, el-Bez M, Simonet M. Investigation of hospital-acquired infections due to *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* by DNA restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994;32:1023–6.
- [21] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9.
- [22] De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S, Haerynck F, Vaneechoutte M. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J Cyst Fibros* 2007;6:75–8.
- [23] Lambiase A, Catania MR, Del Pezzo M, Rossano F, Terlizzi V, Sepe A, et al. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:973–80.
- [24] Doleans-Jordheim A, Courmoyer B, Bergeron E, Croize J, Salord H, Andre J, et al. Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-PCR genotyping in various epidemiological situations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:1105–11.
- [25] Deplano A, Denis O, Rodriguez-Villalobos H, De Ryck R, Struelens MJ, Hallin M. Controlled performance evaluation of the DiversiLab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multidrug-resistant health care-associated bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 2011;49:3616–20.

- [26] Jacquier H, Le Monnier A, Carboneille E, Corvec S, Illiaquer M, Bille E, et al. In vitro antimicrobial activity of “last-resort” antibiotics against unusual nonfermenting gram-negative bacilli clinical isolates. *Microb Drug Resist* 2012;18:396–401.
- [27] Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:918–51.
- [28] Ridderberg W, Wang M, Norskov-Lauritsen N. Multilocus sequence analysis of isolates of *Achromobacter* from patients with cystic fibrosis reveals infecting species other than *Achromobacter xylosoxidans*. *J Clin Microbiol* 2012;50:2688–94.

DEUXIEME ETUDE :

RECHERCHE DE RESERVOIRS ENVIRONNEMENTAUX D'*A. XYLOSOXIDANS*

V-DEUXIEME ETUDE :

RECHERCHE DE RESERVOIRS ENVIRONNEMENTAUX D'*A. xylosoxidans*

A. PRESENTATION DE L'ETUDE

Les résultats présentés dans notre étude sur l'épidémiologie d'*A. xylosoxidans* au CRCM de Dijon ont montré une forte prévalence parmi les patients atteints de mucoviscidose avec un taux de 13,9% contre 4,4% pour la France en 2010. D'autre part, nous avons observé ces dernières années une augmentation de la fréquence d'isolement d'*A. xylosoxidans* dans divers prélèvements réalisés chez les malades hospitalisés au CHU de Dijon.

Le réservoir naturel de cette bactérie ainsi que le mode de contamination des patients ne sont pas connus. Seules des transmissions croisées entre patients et des acquisitions à partir de produits contaminés à l'hôpital ont été décrites. Dans la première étude, la diversité des génotypes au sein des souches d'*A. xylosoxidans* nous a fait évoquer une diversité de sources de contamination pour les patients atteints de mucoviscidose.

Nous avons donc soulevé l'hypothèse d'une contamination des patients à domicile ou dans la nature. Un seul cas est rapporté dans la littérature : il s'agit de la contamination d'un patient non atteint de mucoviscidose par la consommation de l'eau de son puits. Dans la nature, les seules descriptions de la présence d'*A. xylosoxidans* ne concernent que quelques souches isolées principalement dans des sols ou des plantes localisés dans des zones polluées. Nous nous sommes donc interrogés sur la présence d'un réservoir environnemental particulièrement riche à Dijon et en Bourgogne.

Pour répondre en partie à ces interrogations, nous avons recherché la présence d'*A. xylosoxidans* dans l'environnement des patients atteints ou non de mucoviscidose : environnements de la vie quotidienne (domestique / extérieur) et environnement hospitalier. A l'hôpital et dans les domiciles, nous nous sommes focalisés sur d'éventuelles sources de contaminations déjà décrites pour d'autres pathogènes, par exemple les lavabos pour *P. aeruginosa* (Hota *et al.* 2009). Pour les prélèvements d'environnement nous nous sommes intéressés à 2 départements : la Saône et Loire et la Côte d'Or. En effet, 60% de nos patients

colonisés sont originaires de ces 2 départements. Nous avons voulu cibler des sources potentielles de contamination pour les patients pendant leurs activités de promenades ou loisirs : parcs, rivières ou lacs (pêche ou toute autre activité nautique).

Les objectifs de cette étude étaient :

- 1) d'identifier des réservoirs potentiels d'*A. xylosoxidans* dans 3 types d'environnements : environnement hospitalier, environnement domestique et environnement naturel.
- 2) de décrire la sensibilité aux antibiotiques des souches environnementales
- 3) de comparer les souches environnementales aux souches cliniques de notre collection

Notre expérience sur les prélèvements d'environnements hospitaliers ou extra-hospitaliers (eaux, sols, plantes, siphons, WC...) nous a montré qu'il est difficile de détecter *A. xylosoxidans* au sein de la flore bactérienne très riche en bacilles à Gram négatif. Il a donc été nécessaire de mettre au point au préalable un protocole pour l'isolement d'*A. xylosoxidans* dans les prélèvements environnementaux.

B. TECHNIQUES SPECIFIQUES A CETTE ETUDE

a. Mise au point d'un milieu de culture pour la recherche de souches environnementales d'*A. xylosoxidans*

Les divers prélèvements d'intérêt sont riches en bactéries, notamment en bacilles à Gram négatif non fermentaires, mais également quelquefois en entérobactéries. Les milieux usuels de type Drigalski ou Mac Conkey sélectifs des bacilles à Gram négatif ne permettent pas de retrouver *A. xylosoxidans* facilement au sein des prélèvements plurimicrobiens, car cette bactérie est de pousse relativement lente par rapport aux autres bacilles à Gram négatif cités ci-dessus. Afin de faciliter la recherche et l'isolement d'*A. xylosoxidans* dans l'environnement, nous avons donc mis au point un milieu de culture sélectif à base d'antibiotiques.

i) Sélection par les antibiotiques

A. xylosoxidans est naturellement résistant à l'aztréonam (CMI >256mg/L) et aux aminosides contrairement à la plupart des bacilles à Gram négatif, en dehors de *S. maltophilia*.

Des essais préliminaires ont été réalisés en utilisant des géloses Drigalski additionnées d'aztréonam et de gentamicine à différentes concentrations. Cependant les souches testées sur ces milieux ne cultivaient pas ou mal, ceci probablement dû à l'effet synergique des β -lactamines associées aux aminosides (Duez *et al.* 2010).

L'utilisation de l'aztréonam seul a donc été retenue, à la concentration finale de 20 mg/ L en milieu gélosé, concentration permettant d'obtenir une culture homogène à partir d'une colonie. En effet des concentrations supérieures permettaient la culture de la bactérie, mais sous forme de colonies hétérogènes (tailles et aspects différents), ce qui rendrait l'utilisation de ce milieu difficile. Des géloses Drigalski ont donc été additionnées d'aztréonam (AZACTAM[®], poudre pour suspension injectable). Les antibiotiques sont ajoutés après autoclavage et refroidissement à 55°C pour ce qui concerne les milieux solides, ou à température ambiante pour les milieux liquides prêts à l'emploi.

ii) Sélection par le xylose

Les BGN résistants à l'aztréonam cultivent sur la gélose Drigalski contenant de l'aztréonam à 20 mg/L. Il s'avère que de telles bactéries sont parfois nombreuses au sein des prélèvements d'environnement et peuvent masquer la présence d'*A. xylosoxidans* qui cultive plus lentement (*Pseudomonas* sp., *S. maltophilia*, entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre élargi (BLSE), etc ...).

Comme son nom l'indique, *A. xylosoxidans* produit de l'acide à partir du xylose, ceci contrairement à *S. maltophilia* par exemple. Des géloses sélectives des bacilles à Gram négatif de type Drigalski et Mac Conkey, qui contiennent un indicateur de pH, ont donc été additionnées de xylose afin de permettre d'identifier les colonies utilisant le xylose (colorées en jaune ou rouge respectivement pour Drigalski ou Mac Conkey). La base de Mac Conkey a été retenue car l'indicateur coloré, le rouge neutre, est plus sensible aux faibles diminutions de pH produites par l'oxydation des sucres que le bleu de bromothymol présent dans les géloses Drigalski. (Zones de virage des indicateurs colorés: rouge neutre : pH < 6,8 : rouge – pH >8,0 : jaune ; bleu de bromothymol : pH< 6,0 : jaune – pH >7,6 : bleu).

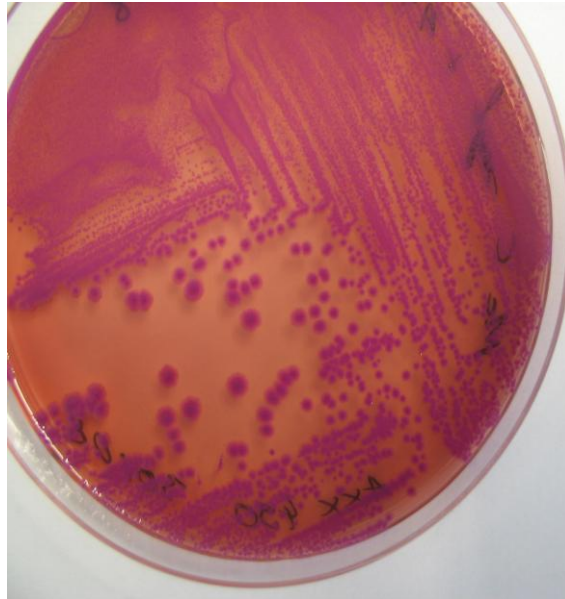


Figure 13 : Culture d'une souche d'*A. xylosoxidans* sur gélose MCX

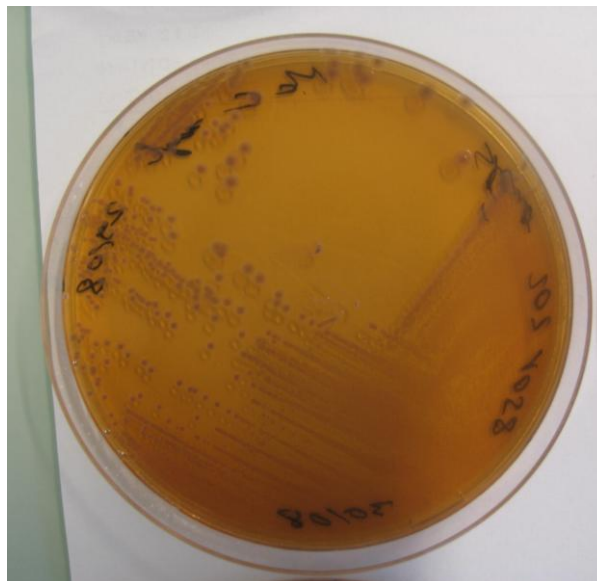


Figure 14 : Culture d'une souche de *S. maltophilia* sur gélose MCX

Après différents essais de concentrations en xylose, la concentration optimale retenue a été de 10 g/l (au-delà la croissance était inhibée, et en dessous les colonies n'étaient pas assez colorées).

Ainsi c'est une base « Mac Conkey-xylose » qui a été utilisée par la suite. Il s'agit d'une gélose Mac Conkey classique : peptone, chlorure de sodium (éléments nutritifs), sels biliaires et cristal violet (inhibiteurs des bactéries à Gram positif), rouge neutre (indicateur de pH), à laquelle du xylose a été ajouté à la place du lactose.

*** Mac Conkey-xylose : (MCX) : composition en g/L :**

- peptone (BD Bacto™).....20
- D-xylose (Sigma Aldrich).....10
- sels biliaires (Oxoid).....1,5
- chlorure de sodium (GenApex)5
- rouge neutre (Sigma-Aldrich)...0,03
- agar (BD Bacto™).....12
- cristal violet (Sigma-Aldrich)...0,001
- eau distillée.....qsp 1L
- ajuster le pH à 7,1 +/- 0.2
- Autoclaver à 116°C pendant 15 minutes.

Sur cette gélose, *A. xylosoxidans* forme des colonies roses rondes à bords réguliers, contrairement à *S. maltophilia* qui forme des colonies jaunes (Figures 13 et 14) et à certains *Pseudomonas* qui forment des colonies roses à bord irrégulier (étalées).

iii) Ajout d'autres antimicrobiens

Malgré les sels biliaires et le cristal violet présents dans la gélose, quelques bactéries à Gram positif parviennent à cultiver sur la gélose MCX. Certains prélèvements sont aussi contaminés par des éléments fongiques (principalement les sols).

C'est pourquoi ont été additionnées de la vancomycine (inhibiteur des bactéries à Gram positif) puis de l'amphotéricine B (inhibiteur des éléments fongiques).

*** Mac Conkey xylose vancomycine-aztréonam-amphotéricine B (MCXVAA) :**

MCX additionnée de vancomycine (vancomycine MYLAN, poudre pour préparations injectable), aztréonam et amphotéricine B (Fungizone[®], poudre pour solution injectable) aux concentrations finales respectives de 20 mg/L, 20 mg/L et 5 mg/L.

Cette dernière gélose présente l'avantage d'être la plus sélective d'*A. xylosoxidans*. Il a été vérifié que toutes nos souches de référence d'*A. xylosoxidans* pouvaient cultiver sur cette gélose. L'aspect des colonies obtenues en 24 à 48h est le même que sur gélose MCX colonies roses rondes et régulières (Figures 13 et 14).

Elle présente cependant deux inconvénients : tout d'abord, certaines souches cliniques cultivent mal (par exemple les souches possédant l'oxacillinase constitutive OXA-243) et ensuite, certains bacilles à Gram négatif résistants à l'aztréonam peuvent cultiver en donnant des colonies roses (certaines souches de *Pseudomonas*, certaines entérobactéries, certains BGNF).

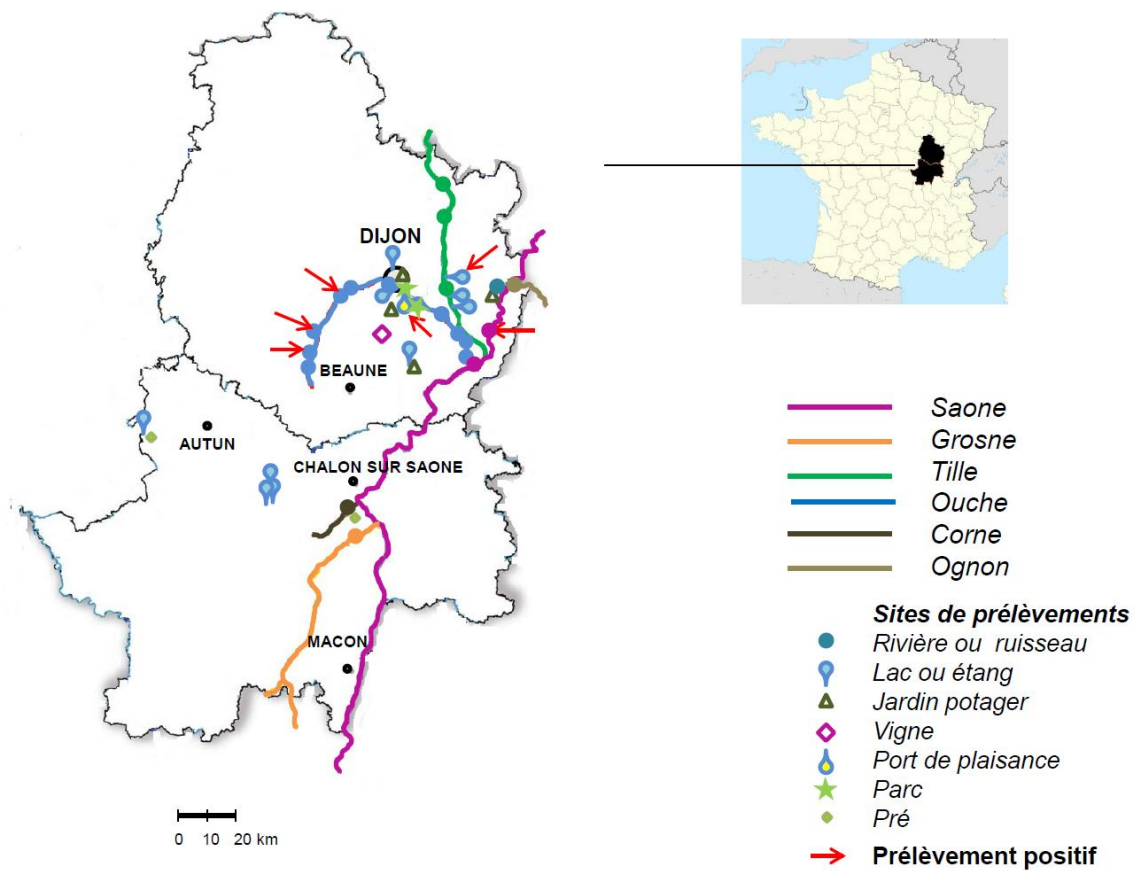


Figure 15 : Sites des différents prélèvements réalisés dans la nature en Saône et Loire et en Côte d'Or.

Les flèches rouges indiquent les sites de prélèvements positifs.

b. Réalisation et prise en charge des prélèvements environnementaux

Entre 2011 et 2012, 339 échantillons ont été collectés :

- **188 prélèvements** au CHU de Dijon dans 10 services différents (4 services de soins intensifs, les services d'hématologie, pneumologie, néphrologie, pédiatrie (et en particulier le service de consultation des patients du CRCM), et l'odontologie.) : siphons des lavabos, douches, rebord intérieur des toilettes, dévidoirs, et l'eau pour soins utilisée dans les fauteuils dentaires.
- **58 prélèvements** au domicile de volontaires sains dans les environs de Dijon (siphons des lavabos, éviers, douches, et toilettes).
- **93 prélèvements d'environnement extérieur** en Saône et Loire et en Côte d'Or : eaux et boues de rivières ou lacs, sols et plantes.

Les sites de réalisation des différents prélèvements sont représentés sur la Figure 15.

La liste détaillée de tous les prélèvements figure en Annexe 6.

i) Réalisation des prélèvements

*** lavabos, éviers, douches, baignoires, toilettes, dévidoirs.**

Ces prélèvements ont été réalisés à l'aide d'écouvillons secs en coton (COPAN) insérés à travers la grille d'évacuation de l'eau ou sous la bonde (à une profondeur d'environ 5 cm), ou au niveau des rebords intérieurs des WC.

***eau des fauteuils dentaires :**

Environ 500 mL d'eau a été recueillie en flacon stérile dans les conditions requises pour l'analyse de la qualité microbiologique des eaux de réseau à l'hôpital.

*** eaux (cours d'eaux, lacs, étangs) :** prélèvement d'environ 500 mL en flacon stérile.

*** boues, terre, végétaux :** prélèvement à l'aide de gants propres et insertion dans des flacons stériles.

ii) Mise en culture des prélèvements

Milieux liquides :

- Bouillon Cœur Cerveille : **BCC** (Biorad, Marnes la Coquette, France)
- BCC additionné d'aztréonam 32mg/L et de vancomycine 32mg/L : **BCC-ATM-V**

Toutes les cultures ont été réalisées à 37°C en atmosphère aérobie.

Afin de faciliter l'isolement d'*A. xylosoxidans* à partir de ce type de prélèvements, une étape préliminaire d'enrichissement sélectif est réalisée pendant 72h en bouillon contenant de la vancomycine et de l'aztréonam (BCC-ATM-V).

-eaux : agitation par retournement, filtration sur membrane (0.45 µm) avec le système Milliflex® Plus (Millipore, Billerica, MA, USA) puis incubation de la membrane dans une boîte de Petri contenant 20 ml de bouillon BCC-ATM-V.

- écouvillons, boues, végétaux :

Une oese de boue, 5 cm² de végétaux ou l'écouvillon sont enrichis dans un tube contenant 10 ml de BCC-ATM-V.

Les bouillons BCC-ATM-V sont incubés en tubes inclinés et légèrement dévissés, à 37°C, pendant 48 à 72h, avant repiquage sur MCXVAA.

Après repiquage, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48h.

iii) Identification et caractérisation des souches

Le protocole d'identification des souches est résumé dans la Figure 16.

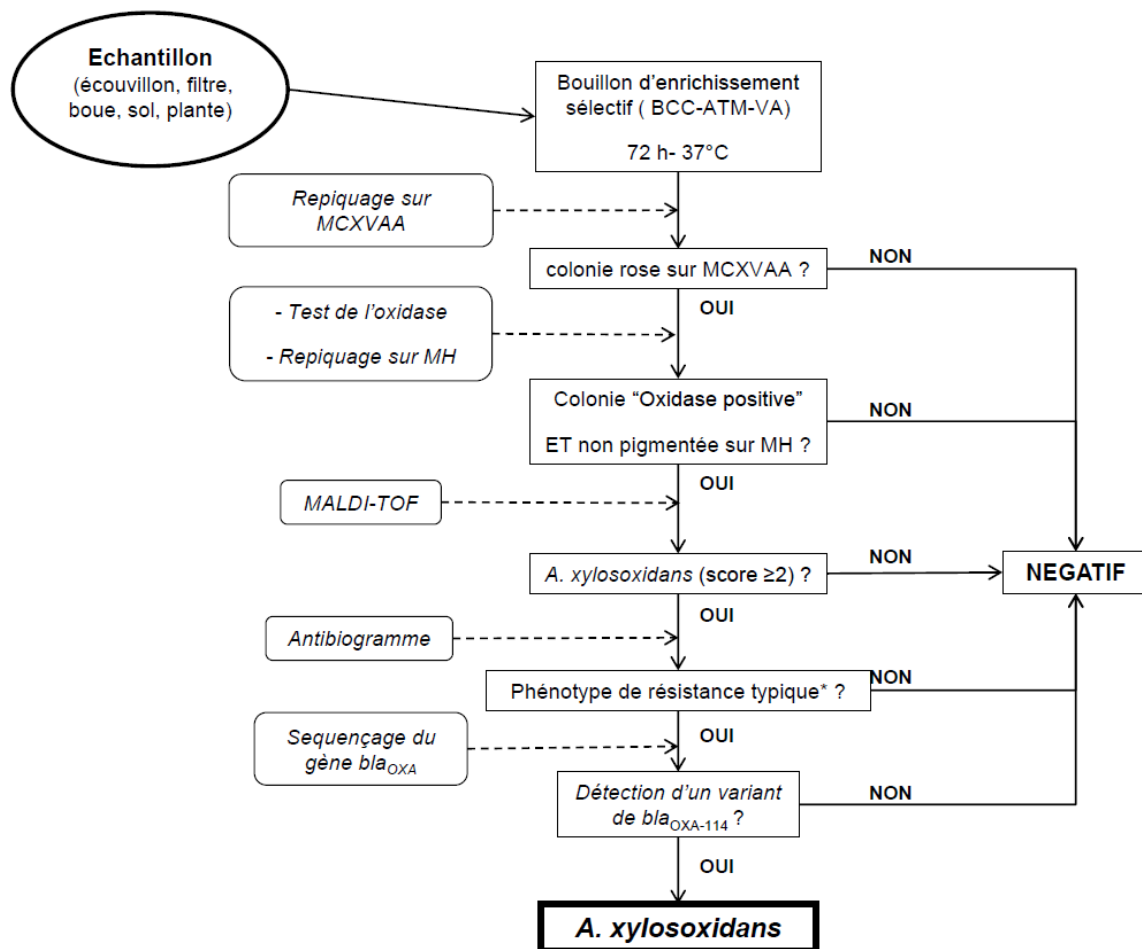


Figure 16 : Protocole de détection d'*A. xylosoxidans* dans les prélèvements.

*profil de résistance typique : résistance aux aminosides, à la céfoxitine, au céfotaxime, au céfépime et à l'aztréonam.

Brièvement, les colonies roses sur MCXVAA ont été réisolées sur gélose MH afin d'observer leur pigmentation et de réaliser le test de l'oxydase. Les colonies présentant une réaction positive au test de l'oxydase et non pigmentées sur MH ont été identifiées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, Bruker) (voir III-1-b). Quand les souches étaient identifiées *A. xylosoxidans* avec un score supérieur à 2, un antibiogramme a été réalisé afin de sélectionner les isolats présentant le profil de résistance typique d'*A. xylosoxidans* (résistance aux aminosides, à la céfoxitine, au céfotaxime, céfépime et à l'aztréonam). Enfin le séquençage du gène codant pour l'oxacillinase constitutive a été réalisé sur les souches sélectionnées. En cas de détection d'une oxacillinase de type OXA-114 ou OXA-243 dans les souches, l'isolat était identifié *A. xylosoxidans*.

Les souches environnementales d'*A. xylosoxidans* ont par la suite été génotypées par ECP et comparées entre elles et avec les souches cliniques de notre collection isolées chez les patients atteints de mucoviscidose (P1 à P31 de l'étude précédente) ainsi que les souches isolées chez 32 patients hospitalisés entre 2006 et 2013 (NCF1 à NCF32 répertoriés en Annexe 7).

C. RESULTATS-DISCUSSION

A notre connaissance, ce travail constitue la première étude rapportant la détection de souches d'*A. xylosoxidans* dans différents types d'environnements ainsi que leur comparaison à des souches cliniques. Une partie de ces travaux a fait l'objet d'une communication affichée en 2012 à un congrès de l'American Society for Microbiology (Annexe 9).

a. Protocole de détection d'*A. xylosoxidans* dans les prélèvements

Le protocole que nous avons utilisé dans cette étude (72 h d'enrichissement sélectif en présence d'aztréonam suivies de l'isolement sur le milieu sélectif MCXVAA) nous a permis d'isoler 50 souches d'*A. xylosoxidans* dans des prélèvements divers : siphons de lavabos, éviers, toilettes et douches mais aussi eaux et boues. La phase d'enrichissement sélectif est cruciale. La sélection par l'aztréonam a permis de s'affranchir de la culture de la plupart des souches de *Pseudomonas* sp. et des entérobactéries.

Nous avons toutefois observé la culture de bactéries naturellement résistantes à cet antibiotique : des souches de *Pseudomonas* sp, *S. maltophilia*, *Chryseobacterium*, *Bordetella*, *Achromobacter* spp., ou de souches présentant des résistances acquises (entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi ou hyperproductrices de céphalosporinase chromosomique). Quelques unes de ces bactéries formaient des colonies roses. L'utilisation du milieu MCXVAA permet de faciliter la détection d'*A. xylosoxidans*, mais une étape supplémentaire d'identification est indispensable. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser la spectrométrie de masse et le profil de résistance aux antibiotiques comme outils de screening avant de confirmer l'identification par le séquençage du gène codant pour l'oxacillinase constitutive.

Il faut noter que dans l'ensemble, 5 prélèvements sur 339 étaient fortement contaminés par des entérobactéries, bactéries de croissance rapide, rendant ainsi la détection d'*A. xylosoxidans* impossible.

Dans certains prélèvements, nous avons pu distinguer plusieurs souches d'*A. xylosoxidans* de morphotypes différents. Parfois elles présentaient des antibiotypes différents, et quelquefois même des génotypes différents (2 exemples dans des prélèvements domestiques de siphons de douche). Comme les prélèvements étaient enrichis il est fort possible que dans les autres cas nous n'ayons pas été capables de détecter plusieurs souches d'*A. xylosoxidans*.

Par ailleurs et comme déjà décrit pour d'autres géloses sélectives, il est probable que notre milieu n'ait pas permis d'isoler toutes les souches présentes dans les prélèvements.

Ces observations et ces données suggèrent que les résultats de cette étude sous-estiment probablement la présence d'*A. xylosoxidans* dans les environnements étudiés.

b. Détection de souches environnementales

Au total, 50 souches d'*A. xylosoxidans* ont été isolées dans les 3 types d'environnements explorés : 33 souches à l'hôpital, 9 souches domestiques et 8 souches dans des prélèvements d'eau ou de boue de rivières ou lacs (Tableaux 11 et 12).

A l'hôpital nous avons isolé les 33 souches dans 9 des 10 services étudiés, dans des lavabos, des douches, mais également des dévidoirs. *A. xylosoxidans* est donc largement répandu dans l'environnement hospitalier de Dijon.

Pour les prélèvements domestiques, il est intéressant de noter qu'*A. xylosoxidans* a été isolé dans des lavabos, des éviers de cuisine ou des douches dans 6 des 16 appartements ou maisons explorés. Comme cela est déjà connu /suspecté pour *P. aeruginosa*, l'environnement domestique peut donc être une source de contamination par *A. xylosoxidans* pour les patients. En particulier les siphons des éviers, des douches ou des lavabos sont souvent recouverts de biofilm et en contact permanent avec des produits d'entretien ou cosmétiques. Beaucoup de ces produits contiennent des ammoniums quaternaires auxquels *A. xylosoxidans* est naturellement résistant (Reverdy *et al.* 1984).

Dans les prélèvements extérieurs, 8 souches ont été isolées dans des rivières ou lacs : 5 souches dans l'Ouche, une dans la Saône à Auxonne, une au lac d'Arc sur Tille et enfin une au Port du Canal de Dijon. Dans tous ces lieux, les activités de loisirs sont importantes (sports nautiques, pêche). Ce sont donc possiblement des sources de contamination pour les patients. La liste des 50 souches avec les résultats de génotypage, de sensibilité aux antibiotiques et le type de variant d'oxacillinase est présentée en Annexe 8.

Source	Lavabo	WC	Douche	Dévidoir	Total prélèvements	Total souches	No de pulsotypes	Pulsotypes (variants d' OXA)
Hôpital								
ICU-1	25 (1)			2	27 (1)	1	1	A (OXA-114h)
ICU-2	11 (1)				11 (1)	1	1	Un. (OXA-114i)
ICU-3	5 (1)			2 (1)	7 (2)	2	1	B (OXA-114p)
ICU-4	7			1	8	0		/
Pédiatrie	8 (3)	1			9 (3)	3	2	C (OXA-114f) D ^a (OXA-114h)
CRCM	4	1		1 (1)	6 (1)	1	1	E (OXA-114f)
Néphrologie	5	1	2 (1)	4 (2)	12 (3)	3	1	F (OXA-114m)
Pneumologie	13 (2)	6	6 (4)	2	27 (6)	7	6	G (OXA-114h) H (OXA-114a) Un. (OXA-114e) Un. (OXA-114g) Un. (OXA-114s) Un. (OXA-114s)
Hématologie	43 (7)	6	17 (3)	1	67 (10)	11	6	C (OXA-114f) I (OXA-114c) Un. (OXA-114g) Un. (OXA-114g) Un. (OXA-114l) Un. (OXA-243e)
Odontologie					14* (4)	4	1	J (OXA-114r)
Total Hôpital	121 (15)	15 (0)	25 (8)	13 (4)	188 (31)	33	19	
Domestique	31 (3)	13 (0)	14 (4)	/	58 (7)	9	9	Un. (OXA-114a) Un. (OXA-114c) Un. (OXA-114c) Un. (OXA-114f) K (OXA-114h) Un. (OXA-114i) Un. (OXA-114j) Un. (OXA-114t) Un. (OXA-114v)

Tableau 11 : Nombre et types de prélèvements hospitaliers et domestiques. En gras entre parenthèses : nombre de prélèvements positifs.

Des lettres ont été attribuées aux pulsotypes retrouvés plus d'une fois. Les pulsotypes en gras sont identiques à ceux de souches cliniques. Un. (unique): pulsotype identifié dans une seule souche. **C** est un pulsotype identifié dans des souches de 2 services différents et dans des souches cliniques. ^a: pulsotype identique à celui d'une souche de la Saône. * eaux des fauteuils dentaires. ICU-1 = Réanimation Médicale. ICU-2 = Réanimation Neuro-traumatologique. ICU-3 = Soins Intensifs de Néphrologie.

Site de prélèvement	No de prélèvements (No de positifs)	No de pulsotypes	Pulsotype (variant d'OXA)	Description du site de prélèvement
Rivière (95,4 km) Ouche				
<i>eau</i>	11 (3)	3	Un. (OXA-114b) Un. (OXA-114g) Un. (OXA-114g)	Port, Sortie de station
<i>boue</i>	13 (2)	2	Un. (OXA-114h) Un. (OXA-114q)	d'épuration
Rivière (480 km) Saône				
<i>eau</i>	2 (1)	1	D ^a (OXA-114h)	Pêche, navigation
Lac (36 ha) Arc s/Tille				
<i>eau</i>	2 (1)	1	Un. (OXA-114u)	Baignade, sports aquatiques
Port du canal Dijon				
(3 ha) <i>eau</i>	1 (1)	1	Un. (OXA-114a)	Port de plaisance
Total	29 (8)	8		

Tableau 12 : Prélèvements positifs dans la nature : caractéristiques des souches (une seule souche isolée par prélèvement positif)

Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de prélèvements positifs pour le site prélevé. Des lettres ont été attribuées aux pulsotypes retrouvés plus d'une fois. Un. (unique): pulsotype identifié une seule fois. ^a: pulsotype identifié également en Pédiatrie.

c. Génomique des souches

Nous avons choisi d'utiliser l'ECP afin de pouvoir comparer les souches isolées dans l'environnement avec celles de notre collection qui ont toutes été génotypées par cette technique. Parmi les 50 isolats environnementaux, nous avons distingué 35 pulsotypes par ECP, ce qui montre une grande diversité au sein des souches. Les 17 souches isolées à l'extérieur de l'hôpital étaient toutes génotypiquement distinctes.

A l'hôpital nous avons mis en évidence la dissémination de souches au sein de certains services. Par exemple les 3 souches isolées en Néphrologie provenant respectivement d'une douche d'une chambre et de 2 dévidoirs situés aux 2 extrémités du service étaient identiques. Il en est de même pour le service de soins intensifs de Néphrologie (ICU-3). Ceci peut témoigner de la contamination des dévidoirs par une souche présente dans une chambre. En Odontologie, la même souche a été retrouvée dans l'eau de 4 fauteuils. Dans ces cas un manuportage au sein des services peut être évoqué.

Nous avons également parfois observé la circulation de souches de même pulsotype dans des services de bâtiments distincts (par exemple de pulsotype C et les services de Pédiatrie et d'Hématologie). Ces deux bâtiments sont alimentés par la même ligne de distribution d'eau, ce qui nous a fait évoquer une contamination des installations par l'eau du réseau. Les souches circulent donc mais elles peuvent également persister. C'est ce que nous avons démontré en répétant les prélèvements sur 2 points contaminés. Dans une auge de lavage de mains d'une chambre de réanimation, la souche avait persisté 5 mois, et dans un dévidoir (dévidoir du service de consultations du CRCM), la souche avait persisté plus de 8 mois. Ceci suggère qu'*A. xylosoxidans* est « installé » dans le biofilm qui se forme naturellement dans les siphons. *A. xylosoxidans* n'a pas été retrouvé dans l'eau du réseau au moment de l'étude. Il est possible que la contamination des installations se soit produite des mois ou des années auparavant, ou encore que les souches ne circulent que ponctuellement et en faible quantité dans le réseau.

La comparaison des souches environnementales aux souches cliniques nous a surpris. En effet 6 génotypes étaient communs entre des souches environnementales et des souches isolées chez des patients (au total 11 patients) (Tableau 13).

Patient	Date d'isolement	Service	Origine	Pulsotype	Origine des souches environnementales isogéniques
NCF4	17/03/2012	Pneumo HC	pulmonaire	I	
NCF5	02/04/2012	Pneumo	pulmonaire	I	
NCF22	28/01/2013	Réa NT	pulmonaire	I	Hémato SC (lavabo et douche)
NCF29	12/11/2012	Hémato	sang	I	
P7	2007	CRCM	pulmonaire	I (AXX53)	
P18	2007	CRCM	pulmonaire	I (AXX53)	
NCF13	11/08/2010	Pneumo SI	pulmonaire	C	Hémato SC (lavabos, douche) ;
NCF18	11/08/2010	Réa Med	pulmonaire	C	Hémato HJ (lavabo) ; Pédiatrie (lavabo)
NCF25	08/11/2011	Réa Med	pulmonaire	A	Réa Med (lavabo, chambre du patient NCF25)
P8	depuis 1997	CRCM	Pulmonaire	K (AXX2)	Domicile (lavabo)
P19	depuis 1995	CRCM	pulmonaire	G (AXX3)	Pneumologie (lavabo)

Tableau 13 : Origine des souches cliniques de même pulsotype que des souches environnementales.

NCF = patient non atteint de mucoviscidose ; Pneumo : Pneumologie ; HC : Hospitalisation complète

Hémato : Hématologie ; SC : Surveillance Continue ; HJ : Hospitalisation de Jour

Réa : Réanimation ; Med = Médicale ; NT = Neuro-Traumatologique ; Ped = pédiatrique

Dans la colonne « pulsotypes » figurent entre parenthèses les pulsotypes identiques attribués aux souches des patients atteints de mucoviscidose (voir étude 1).

Il est intéressant de noter que nous avons retrouvé parmi les souches environnementales (hospitalières ou domestiques), 3 pulsotypes identiques à ceux de souches isolées chez des patients atteints de mucoviscidose. Le pulsotype G d'une souche de pneumologie était identique à celui du patient P19, qui n'avait pas été hospitalisé dans ce service (bâtiment neuf). Le pulsotype K d'une souche isolée d'un domicile était le même que celui du patient P8, sans aucun lien apparent avec le domicile en question. Enfin le pulsotype I de souches isolées en hématologie était identique au pulsotype AXX53 de souches isolées en 2007 chez 2 patients atteints de mucoviscidose (P7 et P18). Pour ces deux patients entre lesquels aucun contact n'avait été mis en évidence, il est probable que la contamination soit donc survenue lors de consultations à l'hôpital. Des pulsotypes communs entre souches hospitalières et souches isolées chez des patients hospitalisés ont été également mis en évidence. Cependant il est impossible de savoir si les patients sont à l'origine de la contamination de l'environnement hospitalier, ou si les malades se contaminent pendant leur séjour à l'hôpital. Par exemple dans un cas la souche clinique et la souche environnementale isogénique ont été isolées sur la même période d'abord chez le patient puis dans sa chambre, mais l'absence de données avant l'arrivée du patient dans le service ne nous permet pas de conclure. Pour tous les autres, il est difficile d'établir des liens : les patients n'avaient pas été hospitalisés dans les services dans lesquels les souches isogéniques ont été détectées, et l'isolement de la souche chez le patient était antérieur à notre étude environnementale. Dans un cas toutefois nous avons fortement évoqué la contamination du patient par une source hospitalière. En effet chez ce patient hospitalisé en réanimation, la souche isolée dans l'aspiration trachéale protégée en 2013 appartenait au pulsotype I. Ce pulsotype avait déjà été identifié dans des souches environnementales de différents services et chez 5 patients entre 2007 et 2012.

d. Sensibilité aux antibiotiques

Les souches environnementales présentaient pour la grande majorité une résistance à la ciprofloxacine (49 souches sur 50). Toutes les souches étaient sensibles à la pipéracilline, la ticarcilline, les associations ticarcilline –acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam, et au méropénème. Ce phénotype est le même que celui des souches de primocolonisation chez les patients.

Enfin 15 souches ont présenté des résistances à l'imipénème. L'une d'entre elles était également résistante à la ceftazidime et 5 au doripénème (Tableau 14).

Il est intéressant de noter que les résistances acquises étaient observées non seulement dans des souches isolées à l'hôpital, mais également dans des souches domestiques ou isolées dans la nature.

	Hôpital n=33	Domestique n=9	Extérieur n=8	Total n=50
TIC	0	0	0	0
TCC	0	0	0	0
PIP	0	0	0	0
TZP	0	0	0	0
CAZ	1	0	0	1
IPM	10	1	4	15
MEM	0	0	0	0
DOR	2	2	1	5
CIP	32	9	8	49

Tableau 14 : Nombre de souches catégorisées intermédiaires ou résistantes parmi les souches d'environnements hospitalier, domestique, ou extérieur. TIC : ticarcilline ; TCC : ticarcilline + acide clavulanique ; PIP : pipéracilline ; TZP : pipéracilline + tazobactam ; CAZ : ceftazidime ; IPM : imipénème ; MEM : méropénème ; DOR : doripénème ; CIP : ciprofloxacine.

e. Séquençage de l'oxacillinase constitutive

Le séquençage de l'oxacillinase constitutive nous a permis de mettre en évidence une grande diversité génétique au sein des souches (avec un total de 17 variants d'OXA-114 et 1 variant d'OXA-243 pour 50 souches).

Dix de ces variants avaient déjà été retrouvés dans des souches cliniques de patients atteints ou non de mucoviscidose (OXA-114a, b ,c ,f ,g ,h ,i, j, l, m) et nous avons mis en évidence 7 nouveaux variants d'OXA-114 (OXA-114p, q, r, s, t, u, v, numéros d'accèsion Genbank KF573363, KF573364, KF573365, KF573366, KF573367, KF573368, et KF573369) et un nouveau variant d'OXA-243 (OXA-243e, numéro d'accèsion Genbank KF582664).

f. Conclusion

Nous avons détecté des réservoirs d'*A. xylosoxidans* dans des lavabos, des éviers et des douches, mais aussi dans des rivières ou des lacs. Le génotypage a montré que certaines de ces souches avaient été isolées également chez des patients. L'ensemble de ces résultats montre que les patients peuvent être exposés à des sources de contamination par *A. xylosoxidans* dans leur vie quotidienne : à domicile, en extérieur (activités aquatiques), ou lors d'hospitalisations.

Il est possible en particulier que les patients se contaminent à partir du biofilm formé dans les siphons par le biais de projections ou « splash-back » au moment de la toilette (lavage de mains, douche, brossage de dents...). Des mesures particulières de nettoyage des siphons pourraient être proposées, afin d'éliminer le biofilm et de diminuer ce risque.

Cette étude est cependant limitée à la région Bourgogne, et il serait nécessaire d'explorer d'autres régions, notamment celles dans lesquelles les patients sont le moins colonisés par *A. xylosoxidans* afin d'émettre des hypothèses quant à la prévalence élevée retrouvée dans notre centre.

D. TEXTE DE L'ARTICLE

**Amoureux L., Bador J., Fardeheb S., Mabile C., Couchot C.,
Massip C., Salignon A. L., Berlie G., Varin V. and Neuwirth C.**

"Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital, domestic,
and outdoor environmental samples and comparison with human
clinical isolates."

Appl Environ Microbiol.

Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in Hospital, Domestic, and Outdoor Environmental Samples and Comparison with Human Clinical Isolates

Lucie Amoureux, Julien Bador, Sakina Fardeheb, Cédric Mabilie, Charlyne Couchot, Clémence Massip, Anne-Lise Salignon, Guillaume Berlie, Véronique Varin and Catherine Neuwirth

Appl. Environ. Microbiol. 2013, 79(23):7142. DOI: 10.1128/AEM.02293-13.

Published Ahead of Print 13 September 2013.

Updated information and services can be found at:
<http://aem.asm.org/content/79/23/7142>

These include:

REFERENCES

This article cites 46 articles, 19 of which can be accessed free at: <http://aem.asm.org/content/79/23/7142#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in Hospital, Domestic, and Outdoor Environmental Samples and Comparison with Human Clinical Isolates

Lucie Amoureux, Julien Bador, Sakina Fardeheb, Cédric Mabilhe, Charlyne Couchot, Clémence Massip, Anne-Lise Salignon, Guillaume Berlie, Véronique Varin, Catherine Neuwirth

Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Universitaire, Dijon, France

Achromobacter xylosoxidans is an aerobic nonfermentative Gram-negative rod considered an important emerging pathogen among cystic fibrosis (CF) patients worldwide and among immunocompromised patients. This increased prevalence remains unexplained, and to date no environmental reservoir has been identified. The aim of this study was to identify potential reservoirs of *A. xylosoxidans* in hospital, domestic, and outdoor environments and to compare the isolates with clinical ones. From 2011 to 2012, 339 samples were collected in Dijon's university hospital, in healthy volunteers' homes in the Dijon area, and in the outdoor environment in Burgundy (soil, water, mud, and plants). We designed a protocol to detect *A. xylosoxidans* in environmental samples based on a selective medium: MCXVAA (MacConkey agar supplemented with xylose, vancomycin, aztreonam, and amphotericin B). Susceptibility testing, genotypic analysis by pulsed-field gel electrophoresis, and *bla*_{OXA-114} sequencing were performed on the isolates. A total of 50 strains of *A. xylosoxidans* were detected in hospital (33 isolates), domestic (9 isolates), and outdoor (8 isolates) samples, mainly in hand washing sinks, showers, and water. Most of them were resistant to ciprofloxacin (49 strains). Genotypic analysis and *bla*_{OXA-114} sequencing revealed a wide diversity among the isolates, with 35 pulsotypes and 18 variants of oxacillinases. Interestingly, 10 isolates from hospital environment were clonally related to clinical isolates previously recovered from hospitalized patients, and one domestic isolate was identical to one recovered from a CF patient. These results indicate that *A. xylosoxidans* is commonly distributed in various environments and therefore that CF patients or immunocompromised patients are surrounded by these reservoirs.

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disorder which affects different organs, including the respiratory system. The presence of abnormal mucus predisposes patients to chronic airway infections. Over the last 2 decades, new emerging bacteria have been found to invade the airways of CF patients, including nontuberculous mycobacteria, *Burkholderia cepacia* complex, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Achromobacter xylosoxidans*. Most of them are multidrug-resistant organisms thought to have been selected by intense antibiotic use over many years (1–4).

A. xylosoxidans is a Gram-negative, aerobic, and oxidase-positive bacillus, often misidentified as *Pseudomonas aeruginosa* (5, 6). It is an opportunistic pathogen that can cause a wide variety of infections in immunocompromised patients (7–10) but is mainly recovered from CF patients' airways. As previously reported, this species is innately resistant to cephalothin, cefoxitin, cefotaxime, aztreonam, and aminoglycosides (11, 12). Acquired resistance to carbapenems, ceftazidime, and ciprofloxacin is frequent, dramatically limiting therapeutic choices (13, 14).

The prevalence of infection or colonization is variable among CF centers, and cases of cross-contamination have been reported (1, 2, 14–16). In France, analysis of the global data from all the centers visited by CF patients revealed an increase in the isolation of *A. xylosoxidans* in recent years, with a rate rising from 2.7% in 2001 to 5.3% in 2011 (http://www.vaincrelamuco.org/e_upload/div/registre_francais_mucoviscidose_2011_15.03.13.pdf). In a recent study, we reported the first epidemiological data about *A. xylosoxidans* in a French CF center (Dijon, Burgundy), with a prevalence of 13.9% among the 120 patients (13). This percentage is, surprisingly, much higher than the one reported in the French global data and does not result from cross-contamination be-

tween the patients. Moreover, we observed an increase in the rate of isolation of *A. xylosoxidans* in hospitalized patients, mainly in intensive care units and hematology wards. This unusually high frequency of *A. xylosoxidans* isolation prompted us to look for specific environmental sources of contamination in the area.

To date, in hospitals, *A. xylosoxidans* has been involved in many procedure-related infections, being associated for instance with contaminated disinfectants (17), dialysis fluids (7), and ultrasound gel (18). There are a few reports of *A. xylosoxidans* being found in outdoor environments, including in some plants (19, 20), in polluted soils (21, 22), and in an indoor swimming pool (23). Nevertheless, the natural habitat of this organism (24, 25) as well as the possible sources of patient contamination remain unknown. Only one report documented the contamination of a patient by an isolate originating from well water (26). The identification of potential reservoirs in the environment might constitute an aid to the prevention of infection in CF patients and in the immunocompromised population. In our laboratory, we have established a collection of all the clinical strains of *A. xylosoxidans* recovered in our hospital, including 808 isolates from CF patients (since 1995) and 32 isolates from non-CF patients (since 2010). For all these isolates, antimicrobial susceptibility tests have been

Received 11 July 2013 Accepted 3 September 2013

Published ahead of print 13 September 2013

Address correspondence to Catherine Neuwirth, catherine.neuwirth@chu-dijon.fr.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.02293-13

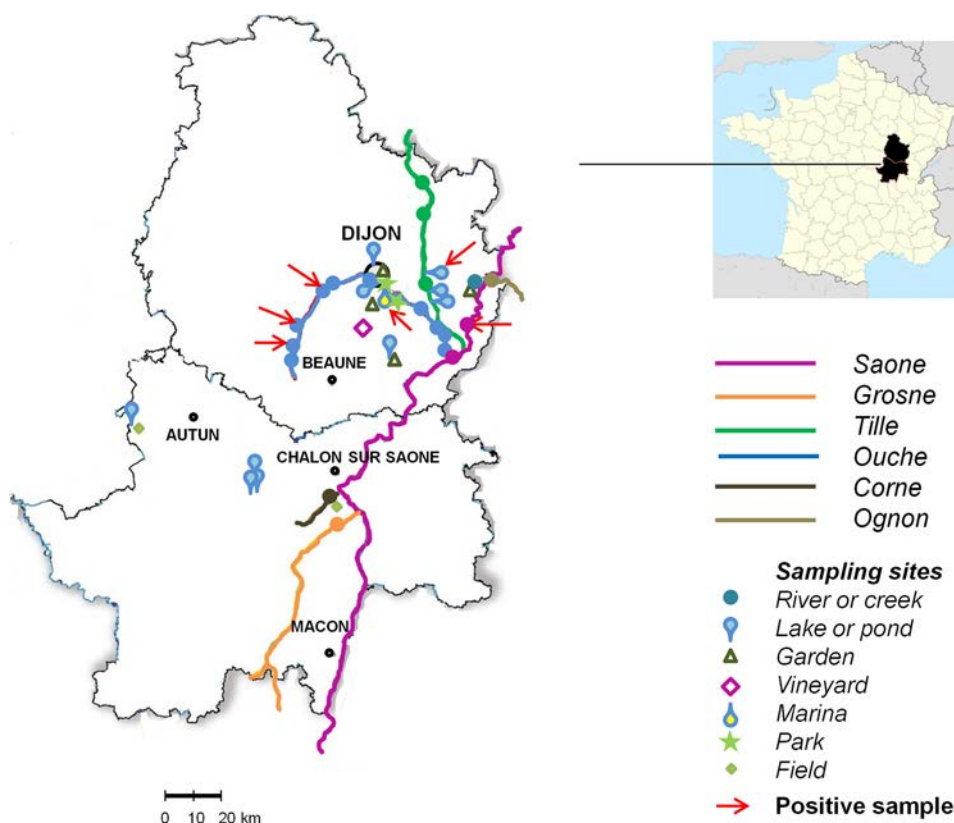


FIG 1 Outdoor sampling sites in Cote d'Or and Saone-et-Loire, France. Red arrows show positive sampling sites. (Map used with permission from CartesFrance.fr.)

performed by the disk diffusion method and genotyping analysis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

The aim of the present study was (i) to search different environments (natural, hospital, and domestic) for the presence of *A. xylosoxidans* strains potentially involved in patient contamination, (ii) to study the antimicrobial susceptibility of the isolates, and (iii) to compare the environmental isolates to clinical isolates from our collection by a genotyping method.

MATERIALS AND METHODS

Sampling sites. We chose various sampling sites to get an overview of the presence of *A. xylosoxidans* in diverse environments: hospital, domestic, and outdoor. For outdoor environment sampling sites, we focused our investigation on Cote d'Or and Saone et Loire. Indeed, more than 60% of CF colonized patients visiting our CF center live in these two areas of Burgundy, France. From September 2011 to December 2012, a total of 339 samples were collected. In the University Hospital of Dijon (1,772 beds), 188 distinct samples were obtained in 10 different departments located in 4 different buildings: 4 intensive care units (ICU), a pneumology and nephrology department (first building), a hematology department (second building), a pediatrics department and the CRCM (Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose), where cystic fibrosis patients receive care (third building), and a dentistry department (fourth building, 5 km away). In each department, environmental wet surfaces in patients' rooms (drains of sinks used for hand washing, shower drains, and toilet bowls) and medication preparation rooms (sink drains) and nearby offices (ward sluice sinks) were swabbed. The number of samples per room depended on the department (e.g., ICU rooms are not equipped with showers or toilets). In the dentistry department, we collected water from dental unit waterlines (14 chairs). A total of 58 domestic samples

were collected from 16 residences of healthy volunteers (bathroom sinks, kitchen sinks, shower drains, and toilet bowls). These apartments or houses were located in Dijon ($n = 14$) and in two villages, Domois ($n = 1$) and St Nicolas les Citeaux ($n = 1$) (10 km south and 35 km south of Dijon, respectively). Finally, 93 samples were obtained from outdoor environments: soils ($n = 8$), waters ($n = 36$), mud from rivers or lakes ($n = 29$), and plants ($n = 20$). The sampling sites included 4 lakes with recreational activities (from 7 to 37 ha), 6 rivers (9 to 480 km long), 1 creek, 1 marina, 6 ponds, 2 fields, 1 vineyard, 2 public parks, and 5 domestic vegetable gardens. Plant collection included the aerial parts (leaf, stem, branch, or fruit) of herbs, moss, vines, mushrooms, strawberries, and oaks and the roots of alfalfa, tomato plants, green bean plants, clover, lupine, carrots, convolvulus, and vines. The outdoor sampling sites are indicated on the map in Fig. 1.

Sample collection. Domestic and hospital samples were obtained using sterile cotton swabs. Sink and shower drains were sampled by rotating a cotton swab inserted approximately 5 cm into the sink drain. Toilets were sampled with sterile cotton swabs inserted under the rim of the toilet bowl. Sluice sinks were sampled by inserting swabs in the wastewater and collection bowl and grid surfaces. Outdoor samples were collected in sterile containers. Approximately 1 g of mud or soil and 5 cm² of parts of plants (roots or aerial parts) were disrupted with sterile devices and then vigorously shaken with brain heart infusion enrichment broth (BHI). Water samples were concentrated by filtration of 500 ml through sterile 0.45- μ m membrane filters (Milliflex Plus; Millipore, Billerica, MA). Samples were stored at room temperature for less than 24 h before processing. The protocol for isolation and identification of *A. xylosoxidans* is presented in Fig. 2.

Culture of the samples. In our experience, from previous studies conducted on hospital environment samples, samples such as those collected in this study often contain a wide diversity of Gram-negative bacilli, including nonfermenting Gram-negative rods (NF-GNB) and *Enterobacte-*

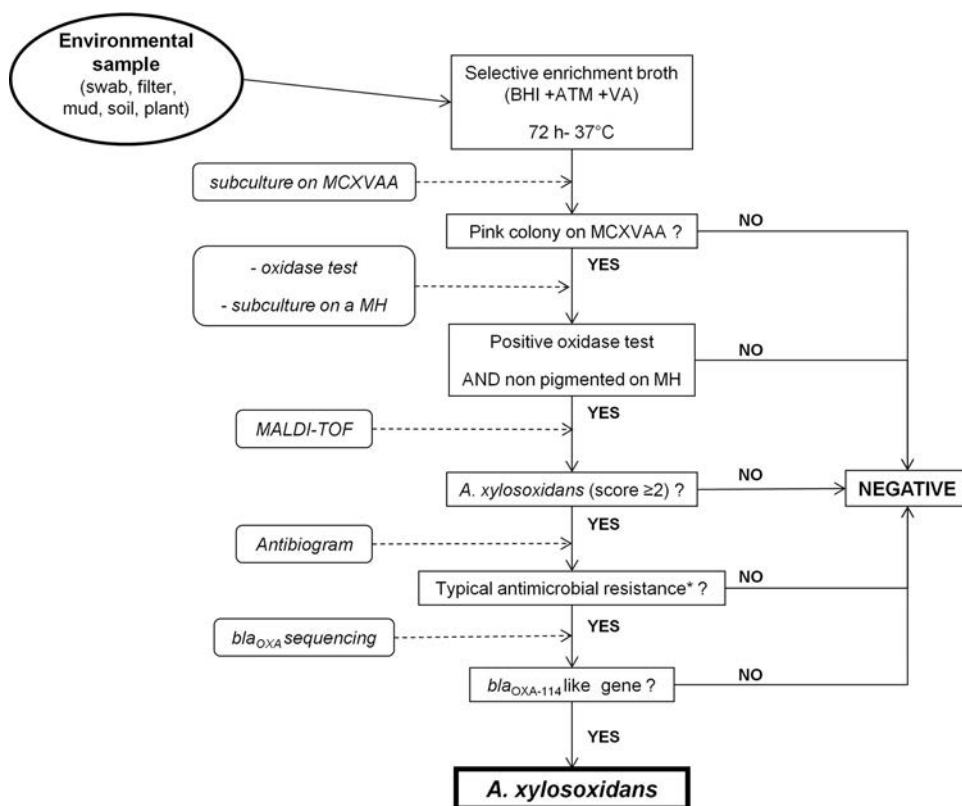


FIG 2 Isolation and identification protocol of *A. xylosoxidans* strains from environmental samples. A typical antibiogram (*) is defined by resistance to all aminoglycosides tested, aztreonam, cefoxitin, cefotaxime, and cefepime. VA, vancomycin; ATM, aztreonam.

riaceae. All these organisms grow on Drigalski agar; therefore, the detection of *A. xylosoxidans* among the environmental flora on this medium is impossible. Given that *A. xylosoxidans* is innately resistant to aztreonam, we tested a Drigalski medium supplemented with this antibiotic. On this medium, we still observed the growth of many different oxidase-positive NF-GNB despite the antibiotic selection. Therefore, we developed a selective enrichment procedure to enhance our ability to detect *A. xylosoxidans* in the samples. Swabs, filters, mud, soil samples, and plants were first enriched with 10 ml of BHI supplemented with aztreonam (32 mg/liter) and vancomycin (32 mg/liter) for 72 h at 37°C. One drop of each of the enrichment cultures was plated on MCXVAA medium and incubated 48 h at 37°C. MCXVAA agar is a medium that we designed for the study: MacConkey agar (selective for Gram-negative rods) supplemented with xylose (5 g/liter), vancomycin (20 mg/liter) (to prevent growth of Gram-positive bacteria), aztreonam (20 mg/liter), and amphotericin B (5 mg/liter) (to prevent fungal growth). In preliminary experiments (data not shown), we checked that *A. xylosoxidans* reference strains (CIP 7132^T, CIP 102236, CIP 101902, and CIP 110540) as well as 15 clinical strains from our previously described collection (13) grew on MCXVAA agar. *A. xylosoxidans* forms pink colonies, resulting from acidification of this medium due to xylose oxidation. Moreover, MCXVAA agar is unable to support the proliferation of Gram-positive bacteria or yeasts/fungi. Nevertheless, it is important to note that other aztreonam-resistant Gram-negative rods are able to grow on this medium. For example *S. maltophilia* forms yellow colonies, and some *Pseudomonas* spp., other *Achromobacter* spp., and *Bordetella* spp. also appear as pink colonies. Therefore, pink colonies must undergo further identification.

Identification. The identification scheme is summarized in Fig. 2. Given that *A. xylosoxidans* is an oxidase-positive bacillus forming pink colonies on MCXVAA agar and nonpigmented ones on Mueller-Hinton agar, we retained for further identification only the strains fulfilling these

3 criteria. These strains were identified by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF; Bruker). This technique proved to be efficient for identifying *A. xylosoxidans* (27–29). According to the manufacturer's instructions, a score of ≥ 2 indicates a "secure genus identification, and probable species identification." Moreover, such a score was obtained for the reference strains CIP 7132^T, CIP 102236, CIP 101902, and CIP 110540. Therefore, the isolates identified as *A. xylosoxidans* with a score of ≥ 2 were subjected to susceptibility tests to select the strains harboring the typical resistance profile (cefoxitin, cefotaxime, cefepime, aztreonam, kanamycin, tobramycin, netilmicin, amikacin, and gentamicin). The last step of identification consisted of detecting and sequencing the naturally occurring *bla*_{OXA} genes of *A. xylosoxidans* (*bla*_{OXA-114} and variants [13, 30, 31] and *bla*_{OXA-243} and variants [13]). We used the primer pair OXA-114A and OXA-114B (30). In cases where PCR was negative, we used the primer pair AXXA-F and AXXA-R (13). Reference strains of *A. xylosoxidans* described above were used as positive controls for PCRs. Positive PCR products were purified with a Millipore centrifugal filter unit (Amicon Microcon PCR kit; Millipore). Double-strand sequencing was then performed using BigDye v1.1 Terminator chemistry and a 3130XL genetic analyzer (Applied Biosystems).

Susceptibility tests. Susceptibility tests of the isolates were performed by the disk diffusion method and interpreted according to recommendations of EUCAST (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf). The following antibiotics were tested: β -lactams (ticarcillin, ticarcillin-clavulanic acid, piperacillin, piperacillin-tazobactam, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, doripenem, and aztreonam), ciprofloxacin, and aminoglycosides (amikacin, gentamicin, kanamycin, netilmicin, and tobramycin).

Genotyping by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). All the strains identified as *A. xylosoxidans* were subjected to genotypic analysis

TABLE 1 Hospital and domestic samples

Source	No. of samples (no. positive)					Total no. of strains	No. of pulsotypes	Pulsotype(s) (OXA variant[s]) ^a
	Handwashing-sink drains	Toilet pans	Shower drains	Sluice sinks	Total			
Hospital								
ICU-1	25 (1)			2	27 (1)	1	1	A (OXA-114h)
ICU-2	11 (1)				11 (1)	1	1	Un. (OXA-114i)
ICU-3	5 (1)			2 (1)	7 (2)	2	1	B (OXA-114p)
ICU-4	7			1	8	0		
Pediatrics	8 (3)	1			9 (3)	3	2	C (OXA-114f), D ^b (OXA-114h)
CF Center	4	1		1 (1)	6 (1)	1	1	E (OXA-114f)
Nephrology	5	1	2 (1)	4 (2)	12 (3)	3	1	F (OXA-114 m)
Pneumology	13 (2)	6	6 (4)	2	27 (6)	7	6	G (OXA-114h), H (OXA-114a), Un. (OXA-114e), Un. (OXA-114g), Un. (OXA-114s), Un. (OXA-114s)
Hematology	43 (7)	6	17 (3)	1	67 (10)	11	6	C (OXA-114f), I (OXA-114c), Un. (OXA-114g), Un. (OXA-114g), Un. (OXA-114l), Un. (OXA-243e)
Dentistry					14 ^c (4)	4	1	J (OXA-114r)
Total	121 (15)	15 (0)	25 (8)	13 (4)	188 (31)	33	19	
Domestic	31 (3)	13 (0)	14 (4)		58 (7)	9	9	Un. (OXA-114a), Un. (OXA-114c), Un. (OXA-114c), Un. (OXA-114f), K (OXA-114h), Un. (OXA-114i), Un. (OXA-114j), Un. (OXA-114t), Un. (OXA-114v)

^a Letters designate pulsotypes that were recovered more than once. Un., unique (i.e., the pulsotype was recovered only once). Pulsotypes in bold are identical to clinical strain pulsotypes. Pulsotype C includes strains from 2 departments and clinical strains.

^b Pulsotype also recovered in one sample from the Saone River.

^c Dental chair water samples.

by PFGE as previously described (32). Total DNA was analyzed after digestion with the restriction enzyme XbaI. Electrophoresis was carried out for 20 h at 5.4 V/cm, with pulse times ranging from 5 s to 35 s, using the CHEF-DR II system (Bio-Rad). Restriction patterns were interpreted according to the criteria of Tenover et al. (33), and the isolates were classified into pulsotypes (A, B, C, etc.). These pulsotypes were compared to those of the clinical isolates of our collection gathered since 2006. We have recently described isolates recovered from 21 CF patients (P1 to P21) (13). Clonally related isolates belong to the same pulsotype. Pulsotypes recovered only once and different from all those already identified to date in our hospital were designated “unique.”

Nucleotide sequence accession numbers. OXA-114p, -114q, -114r, -114s, -114t, -114u, and -114v gene sequences have been submitted to

GenBank under accession numbers [KF573363](#), [KF573364](#), [KF573365](#), [KF573366](#), [KF573367](#), [KF573368](#), and [KF573369](#). OXA-243e's gene sequence has been submitted to GenBank under accession number [KF582664](#).

RESULTS

The results are summarized in [Table 1](#) (hospital and domestic), in [Table 2](#) (outdoor) and in [Table 3](#) (susceptibility tests).

Detection of strains. The protocol used in this study allowed us to identify a total of 50 isolates of *A. xylosoxidans* among the 339 samples, mainly in the hospital environment ($n = 33$) but also in domestic ($n = 9$) and outdoor ($n = 8$) environments.

TABLE 2 Characteristics of the strains found at outdoor positives sampling sites^a

Outdoor source and sample type	No. of samples (no. positive)	No. of pulsotypes	Pulsotype(s) (OXA variant) ^b	Description of source
Ouche River (95.4 km)				
Water	11 (3)	3	Un. (OXA-114b) Un. (OXA-114g) Un. (OXA-114g)	Water treatment, port
Mud	13 (2)	2	Un. (OXA-114h) Un. (OXA-114q)	Water treatment
Saone River water (480 km)	2 (1)	1	D ^c (OXA-114h)	Boating, fishing
Lake Arc-sur-Tille water (36 ha)	2 (1)	1	Un. (OXA-114u)	Swimming, water sports
Dijon Marina water (3 ha)	1 (1)	1	Un. (OXA-114a)	Port
Total	29 (8)	8		

^a Only one strain was isolated from each positive sample.

^b Letters designate pulsotypes that were recovered more than once. Un., unique (i.e., the pulsotype was recovered only once).

^c This pulsotype was also recovered in the pediatrics department of the hospital.

TABLE 3 Number of isolates categorized as intermediate or resistant among hospital, domestic, and outdoor strains

Antimicrobial agent ^a	No. of intermediate or resistant isolates			
	Hospital (n = 33)	Domestic (n = 9)	Outdoor (n = 8)	Total (n = 50)
TIC	0	0	0	0
TCC	0	0	0	0
PIP	0	0	0	0
TZP	0	0	0	0
CAZ	1	0	0	1
IPM	10	1	4	15
MEM	0	0	0	0
DOR	2	2	1	5
CIP	32	9	8	49

^a TIC, ticarcillin; TCC, ticarcillin plus clavulanic acid; PIP, piperacillin; TZP, piperacillin plus tazobactam; CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; CIP, ciprofloxacin.

Hospital samples. A total of 33 strains were isolated in 31 of the 188 samples. All studied wards were concerned with the exception of ICU-4. *A. xylosoxidans* has been recovered in hand-washing sink drains, shower drains, and sluice sinks but not in toilet bowls. Water from 4 of the 14 dental chairs was contaminated with *A. xylosoxidans*.

Domestic samples. A total of 9 strains were isolated in 7 out of the 58 samples. These findings concerned 6 of the 16 residences investigated. *A. xylosoxidans* was detected in 4 of 14 shower drains (6 strains), in 1 of 16 bathroom sink drains (1 strain), and in 2 of 15 kitchen sink drains (2 strains). All 13 toilet bowls sampled were negative.

Outdoor samples. A total of 8 strains were isolated from the 93 samples, all in water or mud samples. None of these strains were isolated from plants or soils. The positive samples are indicated with red arrows in Fig. 1 and described in Table 2. Five strains were isolated from the Ouche River (at 3 different sites), one was from Lake Arc-sur-Tille, one was from the Port du Canal marina in Dijon, and the last one was from the Saone River in Auxonne.

Genotyping by PFGE. Among the 50 isolates obtained, we distinguished 35 pulsotypes with PFGE: 19 pulsotypes in hospital samples, 9 in domestic samples, and 8 in outdoor samples, with one pulsotype being identical in hospital and outdoor isolates. Indeed, the isolate detected in water from the Saone River (pulsotype D) was clonally related to isolates recovered in the pediatrics department (2 different hand-washing sink drains). In samples from the hospital environment, we detected isolates belonging to the same pulsotype (pulsotype C) in two departments, pediatrics (one hand-washing sink drain) and hematology (3 samples in a patient's room located on level 0 of the unit and the hand-washing sink drain of a medication preparation room on level 1). We performed repeated samplings at two locations. The first one was the CF center, where we recovered the isolate harboring pulsotype E twice at an 8-month interval (October 2011 and July 2012). The second location was ICU-1, from which the isolate (pulsotype A) was isolated 3 times (September 2011, October 2011, and February 2012). In the dentistry department, the isolates recovered from the 4 dental chairs water belonged to the same pulsotype (pulsotype J). Comparison of environmental with clinical isolates pulsotypes revealed interesting findings. Among the 35 pulsotypes from environmental isolates, 6 were identical to that of patients. In

ICU-1, the strain recovered from a wound of a patient had the same pulsotype as the one isolated in the hand-washing sink of his room during his hospitalization (pulsotype A). Pulsotype C, including 6 environmental isolates, was identical to that of strains isolated in tracheal aspirates of 2 non-CF patients hospitalized in ICU-1 in 2010. The strain recovered from a shower in the pneumology department was clonally related (pulsotype G) to that recovered from the sputum of a CF patient who had been chronically colonized since 1995 (patient P19) but had not previously been hospitalized in that ward. Pulsotype I, including 2 strains recovered in the hematology ward in December 2012 (1 shower and 1 hand-washing sink in two rooms), also included isolates from 6 patients. Among these patients, only one had been hospitalized in the hematology department (blood culture sampled in November 2012). For the other patients, the strains were recovered from sputum samples. Two of them had been hospitalized: one in the pneumology department (March 2012) and one in ICU-2 (January 2013). One outpatient suffering from bronchiectasis regularly attended the pneumology department. (isolate recovered in April 2012). The last two were CF patients (isolates recovered in 2007–2008) P7 and P32. Finally, one domestic isolate recovered in a hand-washing sink drain was identical (pulsotype K) to that of one CF patient who had been chronically colonized since 1997 (patient P8).

Antimicrobial susceptibilities. The majority of the isolates were resistant to ciprofloxacin (49/50). Fifteen isolates were categorized as intermediate or resistant to imipenem (10 hospital, 4 outdoor, and 1 domestic isolate), with one of them (a hospital isolate) also being resistant to ceftazidime and 5 (2 hospital, 2 outdoor, and 1 domestic isolate) being also resistant to doripenem. All isolates remained susceptible to meropenem, ticarcillin, ticarcillin-clavulanic acid, piperacillin, and piperacillin-tazobactam. The results are reported in Table 3.

bla_{OXA} sequencing. On the basis of antimicrobial susceptibility tests and MALDI-TOF analysis, a total of 51 strains were subjected to PCRs. A PCR product was obtained for 50 isolates and sequenced. We could not detect any *bla_{OXA}* gene in the remaining strain; therefore, this strain was not identified as *A. xylosoxidans* and was excluded from the study. Many variants of OXA-114 have been detected in 49 strains. Among them, the variants OXA-114a, -114b, -114c, -114f, -114g, -114h, -114i, -114j, -114l, and -114m had already been identified in clinical isolates. We also detected 7 new variants: OXA-114p, -114q, -114r, -114s, -114t, -114u, and -114v. Finally, only one strain harbored a variant of OXA-243, the new variant OXA-243e.

DISCUSSION

A. xylosoxidans is an important emerging pathogen among CF patients worldwide, commonly described as an environmental pathogen widely distributed in soils and waters (4, 14, 34, 35). Nevertheless, this statement is not supported by any study in natural environments. The scarce reports concern a very limited number of isolates which were recovered mainly from polluted sites. Because of the high prevalence of *A. xylosoxidans* in our CF center and its emergence in immunocompromised patients hospitalized in our university hospital, an investigation of reservoirs was required. To the best of our knowledge, the present study is the first to look for the presence of *A. xylosoxidans* in various environments and to compare the environmental isolates with the clinical ones. For this comparison, we chose the PFGE method,

commonly used to analyze the clinical isolates of this species (14, 16, 31, 32, 36). Very recently (2012) and after the beginning of the present study, several schemes of multilocus sequence typing were proposed for *A. xylosoxidans* (37, 38). This method seems to be interesting for global epidemiological studies and allows inter-laboratory comparisons. Nevertheless, all the isolates from our collection have been subjected to PFGE analysis since 1995, and we took advantage of this large amount of available data.

In the hospital, environmental samplings targeted potential sources of contamination already reported for other pathogens, such as *P. aeruginosa* (39). For outdoor environmental samples, we focused on two areas of Burgundy (Cote d'Or and Saone et Loire) because most of our infected CF patients live there. We searched for *A. xylosoxidans* in different sites related to various common activities: walking (parks and fields), gardening (gardens), and fishing, swimming, or boating (rivers, lakes, and the marina). Because of bacterial species richness in these environments, we designed for this study an identification procedure and a selective medium (MCXVAA) to detect *A. xylosoxidans*. This allowed us to isolate 50 strains of *A. xylosoxidans* from wet environments, including water, mud, and sink and shower drains. Nevertheless, the use of a selective medium may have led to underestimation of the presence of *A. xylosoxidans*, as already described for other media (40). We observed a high diversity among the 50 environmental isolates: they were classified into 35 pulsotypes. It is noteworthy that the 17 domestic and outdoor strains all belonged to different pulsotypes. Moreover, we detected many oxacillinase variants ($n = 19$). These findings strongly suggested that *A. xylosoxidans* is well adapted to the wet environments of hospitals, outdoor sites, and domiciles that act as reservoirs. In the hospital, we found various *A. xylosoxidans* isolates in 9 out of 10 wards studied. Some hospital isolates had the same pulsotype (33 isolates for 19 pulsotypes). For instance, in the nephrology department, the three strains isolated from different sites (in one patient's room and two sluice sinks) were identical. Similarly, a single strain contaminated the water of four dental chairs. In these cases, hand contamination of staff members might explain the spread of the isolate through the ward. In another case, we suspected contamination of the water distribution pipe. Indeed, six isolates belonging to pulsotype C were recovered in the hematology and pediatrics departments, two wards located in adjacent buildings supplied by the same water distribution line. We did not detect *A. xylosoxidans* in the water (data not shown): perhaps the volume of the water was too small, or more likely the contamination occurred months or years ago. Our bacterial findings provided information about the presence of *A. xylosoxidans* in the sink drain at the moment when we obtained the samples but did not allow us to draw conclusions about the temporal and spatial evolution of the colonization. Nevertheless, the results from repeated samplings at two points indicate that isolates can persist in some sites for long periods (at least 8 months), probably thanks to biofilm formation. Surprisingly, we identified 10 hospital environmental isolates that were indistinguishable from patients' isolates. In most cases, it was not possible to determine if the patients acquired *A. xylosoxidans* from the hospital environment or if the environment had been contaminated by an infected patient, because the patients' strains had been isolated mainly before this study. In all cases but one, the patients had not been hospitalized in the wards where the clonally related environmental isolates were detected. For example, the strains harboring pulsotype I

from the hematology department have also been isolated from 6 patients in samples collected over 6 years (in the pneumology department, the hematology department, ICU-2, and the CF center). This reflects a spread of the isolates in all the wastewater system of the hospital, constituting a reservoir of *A. xylosoxidans*. Therefore, hospitalized patients might be contaminated when splash-back occurs, for instance during showering, hand washing, or tooth brushing, as has been described for other pathogens (41, 42). The role of dental chair waters as a source of contamination has to be taken into account for outpatients receiving dental care.

Our study also pointed out that *A. xylosoxidans* is widespread in outdoor aquatic and in domestic environments. Indeed, the organism was detected in 6 samples from bodies of water used for recreational activities and from 6 of 16 residences. For outdoor environments, 4 isolates were recovered from the Ouche River (water and mud) near the points where the effluents from wastewater treatment stations of local villages flow into the river. Moreover, one isolate recovered from the Saone River, 35 km away from Dijon, was identical to one isolate in the pediatrics department of the hospital (pulsotype D). These findings may reflect bacterial pollution of the rivers by the effluents. In domestic environments, *A. xylosoxidans* was detected in hand-washing sinks and shower drains but not in toilet bowls. The colonization of sinks and shower drains by *P. aeruginosa* has already been described in home environment studies (43, 44). These materials are in contact with soap as well as with chemical products used for cleaning, many of them containing alkyldimethylbenzylammonium chloride, a quaternary ammonium compound. The natural resistance of *A. xylosoxidans* to these compounds might explain its presence in the domestic samples (45). We did not detect *A. xylosoxidans* in the toilet bowls, probably because the site sampled (under the rim of the toilet bowl) is easily accessible for regular cleaning and free of stagnant water. Interestingly, one isolate recovered from a residence located in Dijon was identical to that harbored by a CF patient since 1997 who has always lived 37 km away from Dijon. This finding remains unexplained.

These results indicate that in everyday life, CF patients can be exposed to reservoirs of *A. xylosoxidans*. For several authors, the diversity among CF patients isolates suggested the acquisition from various environmental sources (13, 31, 46). This hypothesis of contamination from these different niches out of hospital is corroborated by several of our observations. First, the environmental isolates described here are varied: they belonged to many distinct pulsotypes and harbored many oxacillinase variants. Second, environmental and clinical isolates share common variants of OXA-114. Finally, with regard to antimicrobial resistance, it is interesting that all environmental strains were resistant to ciprofloxacin and remained susceptible to ticarcillin, piperacillin, ticarcillin-clavulanic acid, and piperacillin-tazobactam like most strains (75%) isolated from CF patients' sputa at first positive culture in our CF center. For the first time, we have identified various environmental reservoirs of *A. xylosoxidans* and demonstrated that some of these isolates are indistinguishable from clinical ones. In hospital and domestic environments, *A. xylosoxidans* is widely encountered in sink drains, which are therefore potential sources of contamination for immunocompromised or CF patients. Particular cleaning procedures might be a help in preventing the acquisition of this emerging pathogen. Larger studies in other geographical regions need to be conducted to confirm our findings. A prospective study analyzing the domestic environ-

ments of CF patients would be of particular interest, and our detection procedure may be suitable for this purpose.

In conclusion, there is a need for a global approach, examining medical but also environmental and probably animal aspects of contamination, to better understand the worldwide increased prevalence of *A. xylosoxidans* infections and its possible relationship to anthropogenic activity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nathalie Sixt and her team, who helped with the water filtration.

REFERENCES

- Ciofu O, Hansen CR, Hoiby N. 2013. Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 19:251–258.
- Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. 2009. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest* 136:1554–1560.
- Salvatore D, Buzzetti R, Baldo E, Furnari ML, Lucidi V, Manunza D, Marinelli I, Messori B, Neri AS, Raia V, Mastella G. 2012. An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 4: update 2011. *J. Cyst. Fibros.* 11:480–493.
- Waters V. 2012. New treatments for emerging cystic fibrosis pathogens other than *Pseudomonas*. *Curr. Pharm. Des.* 18:696–725.
- Hogardt M, Ulrich J, Riehn-Kopp H, Tummler B. 2009. EuroCareCF quality assessment of diagnostic microbiology of cystic fibrosis isolates. *J. Clin. Microbiol.* 47:3435–3438.
- Kidd TJ, Ramsay KA, Hu H, Bye PT, Elkins MR, Grimwood K, Harbour C, Marks GB, Nissen MD, Robinson PJ, Rose BR, Sloots TP, Wainwright CE, Bell SC. 2009. Low rates of *Pseudomonas aeruginosa* misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 47:1503–1509.
- Ahmed MS, Nistal C, Jayan R, Kuduvali M, Anijeet HK. 2009. *Achromobacter xylosoxidans*, an emerging pathogen in catheter-related infection in dialysis population causing prosthetic valve endocarditis: a case report and review of literature. *Clin. Nephrol.* 71:350–354.
- Aisenberg G, Rolston KV, Safdar A. 2004. Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989–2003). *Cancer* 101:2134–2140.
- Tena D, Gonzalez-Praetorius A, Perez-Balsalobre M, Sancho O, Bisquet J. 2008. Urinary tract infection due to *Achromobacter xylosoxidans*: report of 9 cases. *Scand. J. Infect. Dis.* 40:84–87.
- Turel O, Kavuncuoglu S, Hosaf E, Ozbek S, Aldemir E, Uygur T, Hatipoglu N, Siraneci R. 2013. Bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* in neonates: clinical features and outcome. *Braz. J. Infect. Dis.* 17:450–454.
- Bador J, Amoureux L, Blanc E, Neuwirth C. 2013. Innate aminoglycoside resistance of *Achromobacter xylosoxidans* is due to AxyXY-OprZ, an RND-type multidrug efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:603–605.
- Bador J, Amoureux L, Duez JM, Drabowicz A, Siebor E, Llanes C, Neuwirth C. 2011. First description of an RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:4912–4914.
- Amoureux L, Bador J, Siebor E, Taillefumier N, Fanton A, Neuwirth C. 2013. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: first French data. *J. Cyst. Fibros.* 12:170–176.
- Lambiase A, Catania MR, Del Pezzo M, Rossano F, Terlizzi V, Sepe A, Raia V. 2011. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30:973–980.
- De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S, Haerynck F, Vanechoutte M. 2007. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J. Cyst. Fibros.* 6:75–78.
- Pereira RH, Carvalho-Assef AP, Albano RM, Folescu TW, Jones MC, Leao RS, Marques EA. 2011. *Achromobacter xylosoxidans*: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 49:3649–3651.
- Molina-Cabrillana J, Santana-Reyes C, Gonzalez-Garcia A, Bordes-Benitez A, Horcajada I. 2007. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* pseudobacteremia in a neonatal care unit related to contaminated chlorhexidine solution. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26:435–437.
- Olshtain-Pops K, Block C, Temper V, Hidalgo-Grass C, Gross I, Moses AE, Gofrit ON, Benenson S. 2011. An outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* associated with ultrasound gel used during transrectal ultrasound guided prostate biopsy. *J. Urol.* 185:144–147.
- Ho YN, Mathew DC, Hsiao SC, Shih CH, Chien MF, Chiang HM, Huang CC. 2012. Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. *J. Hazard Mater.* 219–220:43–49.
- Jha P, Kumar A. 2009. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microb. Ecol.* 58:179–188.
- Buckova M, Godocikova J, Zamocky M, Polek B. 2010. Screening of bacterial isolates from polluted soils exhibiting catalase and peroxidase activity and diversity of their responses to oxidative stress. *Curr. Microbiol.* 61:241–247.
- Singh NS, Singh DK. 2011. Biodegradation of endosulfan and endosulfan sulfate by *Achromobacter xylosoxidans* strain C8B in broth medium. *Biodegradation* 22:845–857.
- Holmes B, Snell JJ, Lapage SP. 1977. Strains of *Achromobacter xylosoxidans* from clinical material. *J. Clin. Pathol.* 30:595–601.
- Brusse HJ, Auling G. 2005. Genus II. *Achromobacter* Yabuuchi and Yano 1981, 477^{VP} emend. Yabuuchi, Kawamura, Kosako and Ezaki 1998a, 1083, p 658–662. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 2, part C. Springer, New York, NY.
- Wirsing von Konig CH RM, Coenye T. 2011. Bordetella and related genera, p 739–750. In Versalovic J CK, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (ed), *Manual of clinical microbiology*, 10th ed, vol 1. ASM Press, Washington, DC.
- Spear JB, Fuhrer J, Kirby BD. 1988. *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) bacteremia associated with a well-water source: case report and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* 26:598–599.
- Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti JL, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, Segonds C, Berche P, Nassif X, Ferroni A. 2008. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 46:3361–3367.
- Desai AP, Stanley T, Atuan M, McKey J, Lipuma JJ, Rogers B, Jerris R. 2012. Use of matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in a paediatric clinical laboratory for identification of bacteria commonly isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Pathol.* 65:835–838.
- Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, Hyman J, Walsh J, Arbefeville S, Howard W, Pruessner J, Safwat N, Cockerill FR, Bossler AD, Patel R, Richter SS. 2012. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 50:2034–2039.
- Doi Y, Poirel L, Paterson DL, Nordmann P. 2008. Characterization of a naturally occurring class D beta-lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1952–1956.
- Turton JF, Mustafa N, Shah J, Hampton CV, Pike R, Kenna DT. 2011. Identification of *Achromobacter xylosoxidans* by detection of the *bla*_{OXA-114-like} gene intrinsic in this species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70:408–411.
- Cheron M, Abachin E, Guerot E, El-Bez M, Simonet M. 1994. Investigation of hospital-acquired infections due to *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* by DNA restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 32:1023–1026.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239.
- Barrado L, Branas P, Orellana MA, Martinez MT, Garcia G, Otero JR, Chaves F. 2013. Molecular characterization of *Achromobacter* isolates from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in Madrid, Spain. *J. Clin. Microbiol.* 51:1927–1930.
- Siebor E, Llanes C, Lafon I, Ogier-Desserrey A, Duez JM, Pechinot A, Caillot D, Grandjean M, Sixt N, Neuwirth C. 2007. Presumed pseudo-

- bacteremia outbreak resulting from contamination of proportional disinfectant dispenser. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26:195–198.
36. Moissenet D, Baculard A, Valcin M, Marchand V, Tournier G, Garbarg-Chenon A, Vu-Thien H. 1997. Colonization by *Alcaligenes xylosoxidans* in children with cystic fibrosis: a retrospective clinical study conducted by means of molecular epidemiological investigation. Clin. Infect. Dis. 24: 274–275.
 37. Ridderberg W, Wang M, Nørskov-Lauritsen N. 2012. Multilocus sequence analysis of isolates of *Achromobacter* from patients with cystic fibrosis reveals infecting species other than *Achromobacter xylosoxidans*. J. Clin. Microbiol. 50:2688–2694.
 38. Spilker T, Vandamme P, Lipuma JJ. 2012. A multilocus sequence typing scheme implies population structure and reveals several putative novel *Achromobacter* species. J. Clin. Microbiol. 50:3010–3015.
 39. Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G, Gardam MA. 2009. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 30:25–33.
 40. Kodaka H, Iwata M, Yumoto S, Kashitani F. 2003. Evaluation of a new agar medium containing ceftrimide, kanamycin and nalidixic acid for isolation and enhancement of pigment production of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. J. Basic Microbiol. 43:407–413.
 41. Breathnach AS, Cubbon MD, Karunaharan RN, Pope CF, Planche TD. 2012. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in two hospitals: association with contaminated hospital waste-water systems. J. Hosp. Infect. 82:19–24.
 42. Hoque SN, Graham J, Kaufmann ME, Tabaqchali S. 2001. *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* outbreak associated with colonization of water taps in a neonatal intensive care unit. J. Hosp. Infect. 47:188–192.
 43. Regnath T, Kreutzberger M, Illing S, Oehme R, Liesenfeld O. 2004. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in households of patients with cystic fibrosis. Int. J. Hyg. Environ. Health 207:585–588.
 44. Schelstraete P, Van Daele S, De Boeck K, Proesmans M, Lebecque P, Leclercq-Foucart J, Malfroot A, Vaneechoutte M, De Baets F. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* in the home environment of newly infected cystic fibrosis patients. Eur. Respir. J. 31:822–829.
 45. Reverdy ME, Frenay J, Fleurette J, Coulet M, Surgot M, Marmet D, Ploton C. 1984. Nosocomial colonization and infection by *Achromobacter xylosoxidans*. J. Clin. Microbiol. 19:140–143.
 46. Ridderberg W, Bendstrup KE, Olesen HV, Jensen-Fangel S, Nørskov-Lauritsen N. 2011. Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment. J. Cyst. Fibros. 10:466–469.

DISCUSSION

VI-DISCUSSION

L'émergence d'*A. xylosoxidans* chez les patients atteints de mucoviscidose est un phénomène reconnu dans le monde depuis une dizaine d'années mais qui reste encore inexpliqué à ce jour. Les résultats de ce travail apportent quelques éléments de réponse et d'orientation dans la réflexion.

Nous avons vu que cette bactérie était difficile à identifier par les méthodes conventionnelles au laboratoire avec la possibilité de nombreuses confusions d'identification. L'amélioration des techniques d'identification des pathogènes « rares » dans la mucoviscidose ces dernières années, grâce à l'utilisation notamment des techniques de séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ou de la spectrométrie de masse pourraient expliquer en partie cette émergence (Kidd *et al.* 2009; Waters 2012). Il est donc difficile de savoir si l'émergence actuellement constatée correspond à une réelle augmentation du nombre de patients colonisés ou simplement à une meilleure détection de cet agent pathogène. Dans notre CRCM, les chiffres de prévalence sont élevés mais stables depuis plus de 8 ans alors que pour les données globales françaises ou américaines par exemple, cette prévalence continue d'augmenter régulièrement. Il est possible que l'augmentation continue de la prévalence globale ne soit que le reflet de la mise en place progressive dans les centres de ces nouvelles techniques d'identification. Il faut souligner ici que la méthode de détection d'*A. xylosoxidans* dans notre laboratoire n'a pas changé ces dernières années. Elle repose sur des caractères phénotypiques (caractères biochimiques ainsi que la reconnaissance du phénotype très particulier de résistance aux antibiotiques). Le recours aux nouvelles techniques n'a fait que confirmer l'identification de nos souches.

Seule l'observation de l'évolution de la fréquence d'isolement d'*A. xylosoxidans* dans les années à venir nous permettra de trancher sur l'éventuelle augmentation de la prévalence.

Néanmoins la prévalence dans notre centre reste très élevée par rapport à d'autres centres en France, et il était nécessaire d'en rechercher d'éventuelles causes.

Une hypothèse concernant l'émergence de nouveaux agents pathogènes dans la mucoviscidose est évoquée par plusieurs auteurs : leur multi-résistance naturelle aux antibiotiques pourrait favoriser leur sélection au cours des antibiothérapies itératives administrées chez ces patients. Concernant *S. maltophilia* par exemple, il a été émis

l'hypothèse selon laquelle les cures itératives d'antibiotiques à large spectre seraient un facteur de risque d'acquisition de cette bactérie, notamment dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* par l'utilisation de quinolones (Denton *et al.* 1996; Talmaciu *et al.* 2000; Graff and Burns 2002) mais également toutes les antibiothérapies au long cours par voie orale, inhalée ou intraveineuse (Denton *et al.* 1996; Talmaciu *et al.* 2000). Nous avons vu que les souches d'*A. xylosoxidans* arborent fréquemment des résistances à la ciprofloxacine et comme *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* présente une résistance naturelle à la tobramycine, molécule largement utilisée contre *P. aeruginosa*. Une seule étude (Burns *et al.* 1999) a rapporté l'impact de l'utilisation de la tobramycine inhalée sur l'émergence de bactéries naturellement résistantes chez les patients (dans le cadre d'un essai clinique tobramycine inhalée versus placebo). Elle a montré que dans le groupe tobramycine inhalée, la prévalence de patients colonisés par *A. xylosoxidans* n'était pas plus élevée que dans le groupe placebo, mais la durée de l'étude était courte (6 mois). Dans notre centre, les patients colonisés par *A. xylosoxidans* n'avaient pas tous été colonisés par *P. aeruginosa* auparavant, mais avaient cependant tous reçu des cures d'antibiotiques avant primocolonisation. La diversité des antibiothérapies administrées chez les patients (diversité des agents pathogènes isolés, co-infections fréquentes) rend très difficile voire illusoire d'envisager qu'une étude puisse identifier le (ou les) traitement(s) le(s) plus à risque de sélectionner *A. xylosoxidans*.

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que le principal facteur de risque d'acquisition d'*A. xylosoxidans* serait en réalité un état plus avancé dans la dégradation de la fonction respiratoire (De Baets *et al.* 2007), comme également évoqué pour *S. maltophilia*. Récemment le suivi d'une cohorte de 601 patients atteints de mucoviscidose pendant 12 ans a confirmé que les patients présentant le plus fort déclin de la fonction respiratoire (évalué par la mesure du FEV₁) étaient plus à risque d'être colonisés par *S. maltophilia* (Stanojevic *et al.* 2013). Dans cette étude, de façon surprenante, le risque de colonisation était moins élevé chez des patients ayant des antécédents d'infection à *P. aeruginosa* ou *B. cepacia* complex et également chez ceux ayant reçu le plus d'antibiothérapies orales ou intraveineuses. Les auteurs expliquent que les effets protecteurs des antibiothérapies seraient dus à un meilleur maintien de l'état pulmonaire des patients traités et qu'il est possible que *S. maltophilia* s'installe moins facilement dans les voies respiratoires si d'autres bactéries comme *P. aeruginosa* ou *B. cepacia* les ont déjà colonisées. Les résultats de notre étude montrent en revanche que la colonisation par *P. aeruginosa* ne prévient pas la survenue de colonisation par *A. xylosoxidans*.

Les résultats de ce travail ne nous permettent donc pas de conclure quant aux causes de l'émergence d'*A. xylosoxidans*, qui est probablement multi-factorielle, mais il apporte quelques éléments de réponse concernant l'origine de la contamination des patients. Tout d'abord, la diversité des génotypes retrouvée au sein des souches d'*A. xylosoxidans* nous a permis d'exclure comme principal mode de contamination une source commune ou des transmissions directes ou indirectes entre les patients. Nous avons alors évoqué l'acquisition de souches environnementales d'origines variées. Notre travail a permis de mettre en évidence différentes niches d'*A. xylosoxidans* pouvant jouer le rôle de source de contamination pour les patients. En effet dans ces réservoirs, les souches environnementales partagent des caractéristiques avec celles des souches cliniques. Tout d'abord nous avons mis en évidence des génotypes communs. Il est difficile d'établir les relations entre l'environnement et les patients (colonisation de l'environnement par le malade, ou contamination du malade par l'environnement ?). Cependant l'isolement chez un malade hospitalisé d'une souche d'un génotype précédemment identifié à l'hôpital et chez d'autres malades nous a fortement fait évoquer une acquisition nosocomiale. Ensuite, nous avons remarqué que les souches de primocolonisation des patients présentent des phénotypes comparables aux souches de l'environnement, en particulier une résistance presque constante à la ciprofloxacine mais une sensibilité aux carbapénèmes et à la ceftazidime. L'acquisition de résistances à ces dernières molécules se développerait au cours de la colonisation chronique des patients, résultant probablement d'expositions répétées aux antibiotiques. Pour exemple, le phénotype particulier de résistance aux carbapénèmes (sensibilité à l'imipénème, résistance au méropénème) n'a jamais été retrouvé dans les souches environnementales ou de primocolonisation des patients.

Dans ce travail, nous avons identifié plusieurs sources potentielles de contamination : les lavabos, éviers, douches, les eaux des fauteuils dentaires ainsi que des eaux de rivières ou de lacs.

Les lavabos ont déjà été incriminés dans des épidémies à *P. aeruginosa* ou à entérobactéries multi-résistantes à l'hôpital (Hota *et al.* 2009; Lowe *et al.* 2012). Une équipe a montré à l'aide d'un marqueur fluorescent inséré directement dans le siphon d'un lavabo, que lors d'un lavage de mains, de la fluorescence pouvait être retrouvée jusqu'à 1 mètre du lavabo. Ce phénomène d'éclaboussures provenant du siphon, appelé « splash-back » est favorisé lorsque l'eau du robinet s'écoule directement dans le siphon et lorsque la pression d'arrivée d'eau est importante (Hota *et al.* 2009). *A. xylosoxidans* présente également la

capacité de former des biofilms (Jakobsen *et al.* 2013) ainsi qu'une résistance naturelle à certains désinfectants utilisés couramment à l'hôpital comme les ammoniums quaternaires (Reverdy *et al.* 1984). Au CHU de Dijon, il est possible que les méthodes de désinfection des lavabos ou douches récemment mis en place et bannissant l'utilisation de dérivés chlorés aient favorisé le développement d'*A. xylosoxidans* au sein des biofilms, ce qui pourrait expliquer son émergence chez les patients hospitalisés. Le nettoyage des lavabos à l'hôpital consiste à verser une solution désinfectante, ce qui ne suffit pas pour éliminer les bactéries ancrées dans le biofilm. L'eau de Javel ou le dioxyde de chlore (Securox[®]) qui étaient utilisés auparavant pour la désinfection des surfaces ou des réseaux d'eaux étaient probablement plus efficaces sur *A. xylosoxidans* que les solutions de Surfanios actuellement disponibles (ammoniums quaternaires). De plus au CHU de Dijon, il a été choisi de mettre des grilles dans les lavabos des nouveaux locaux, ce qui ne protège pas des éclaboussures provenant du siphon et complique la mise en place de mesures éventuelles de nettoyage du biofilm.

Notre étude a montré également qu'*A. xylosoxidans* n'était pas seulement présent à l'hôpital mais également dans les lavabos et douches domestiques. Ces derniers peuvent donc jouer un rôle dans la contamination des patients atteints de mucoviscidose, non seulement par *A. xylosoxidans*, mais également par d'autres agents pathogènes lors de la toilette (brossage de dents, lavage de mains, douche par exemple). Il est possible que l'utilisation à domicile de nombreux produits ménagers ou cosmétiques dans les salles de bains soit à l'origine de la sélection d'*A. xylosoxidans*. En effet, les produits cosmétiques contenant de la chlorhexidine ou des ammoniums quaternaires sont très répandus : bains de bouche, crèmes, solutions désinfectantes, dentifrices, savons, shampoings, après-shampoings, etc... Il a été montré par ailleurs que des souches d'*Achromobacter* avaient pu être isolées dans des lavabos après exposition au triclosan (McBain *et al.* 2003). Ce dérivé organochloré est également très utilisé dans les produits cosmétiques (déodorants, dentifrices, savons, mousses à raser, eaux de Parfum) de toutes marques.

Concernant les fauteuils dentaires, l'eau utilisée pour les soins est stockée dans les fauteuils et pourtant mélangée à des solutions antiseptiques. Mais ces solutions sont composées de brome et d'ammoniums quaternaires (à Dijon), ce qui est probablement sans effet sur *A. xylosoxidans* installé dans le biofilm. Il a été bien décrit que l'eau des fauteuils dentaires jouait le rôle de réservoir de bactéries. En particulier dans la mucoviscidose, une étude a montré que des souches de *P. aeruginosa* présentes dans l'eau des fauteuils dentaires

avaient contaminé des patients (Jensen *et al.* 1997). Chez ces malades, ainsi que chez les malades immunodéprimés, l'utilisation de ce type d'eau pour soins devrait être proscrite.

Les appareils de nébulisation ont été également évoqués comme sources de contamination possibles par différents agents pathogènes pour les patients. Pour *A. xylosoxidans*, on pourrait suspecter l'eau du robinet utilisée pour le rinçage. Les différentes études disponibles à ce jour montrent toutefois que si le protocole de désinfection est bien respecté, il ne reste pas de bactéries viables dans l'appareil (Heijerman *et al.* 2009). En ce qui concerne en particulier *A. xylosoxidans*, il faut s'assurer que l'étape de séchage soit bien respectée.

Enfin les eaux de rivières ou de lacs constituent des réservoirs pouvant également être à l'origine de la contamination des patients par *A. xylosoxidans* lors d'activités aquatiques. L'exposition étant peu fréquente, ce mode de contamination joue probablement un rôle mineur dans l'acquisition d'*A. xylosoxidans*.

Un mode de contamination à partir du sol ou des plantes serait probablement possible mais notre travail n'a pas permis de mettre en évidence *A. xylosoxidans* dans les prélèvements étudiés. Le faible nombre de prélèvements ne nous permet pas de conclure sur cette question.

Notre travail a permis de mettre en évidence différents réservoirs d'*A. xylosoxidans* en Bourgogne. Cependant au vu de l'émergence mondiale d'*A. xylosoxidans*, des études à plus grande échelle sont nécessaires, afin d'identifier plus précisément les réservoirs d'*A. xylosoxidans*, et éventuellement de pouvoir prévenir la contamination des patients.

Il est possible que l'émergence d'*A. xylosoxidans* soit liée à une augmentation de la présence de souches d'*A. xylosoxidans* dans l'environnement. En effet, *A. xylosoxidans* est retrouvé dans la nature dans des milieux particulièrement pollués (phénols, hydrocarbures, monochlorobiphényles, métaux, insecticides). Les activités humaines influencent probablement le risque de sélectionner *A. xylosoxidans* dans l'environnement, puisque cette bactérie est capable non seulement de survivre, mais également d'utiliser tous ces toxiques lors de sa croissance. Comme cela est connu pour *BCC*, cette bactérie semble être bénéfique pour l'environnement, et se comporter comme un pathogène pour l'homme (Mahenthiralingam *et al.* 2005). Enfin les fluoroquinolones sont très utilisées dans le domaine vétérinaire (animaux d'élevage ou de compagnie), et de surcroît très stables dans l'environnement (Wellington *et al.* 2013). Le rapport de l'ANSES (Agence Nationale de

Sécurité Sanitaire) de 2011 portant sur les ventes des antibiotiques à usage vétérinaire ¹⁰ montre que l'exposition des animaux aux fluoroquinolones a doublé en 13 ans (parallèlement à la mise sur le marché d'une trentaine de nouveaux antibiotiques de cette famille). La résistance presque constante des souches d'*A. xylosoxidans* à la ciprofloxacine dans l'environnement pourrait résulter d'une sélection de mutants résistants due au relargage de quinolones dans les eaux usées, dans les sols, ou les rivières (utilisation en médecine humaine et vétérinaire).

Dans l'ensemble, de nombreux composés chimiques sont donc capables de sélectionner *A. xylosoxidans* dans l'environnement. Il est possible que ces pollutions d'origine agricole, animale, industrielle, ou domestique constituent des facteurs de risque supplémentaires d'acquisition d'*A. xylosoxidans* par les patients.

¹⁰ Agence nationale du médicament vétérinaire. Anne Chevance et Gérard Moulin, Anses – ANMV. « Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2011 ». Octobre 2012. <http://www.anses.fr/Documents/ANMV-Ra-Antibiotiques2011.pdf>

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

VII-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que la prévalence d'*A. xylosoxidans* était élevée au CRCM de Dijon, et ne résultait pas d'une source commune de contamination des patients. Devant les grandes disparités observées entre les centres, il est indispensable de comparer nos résultats avec ceux d'autres centres en utilisant les mêmes techniques de détection et d'identification des souches. Pour ce faire il serait intéressant d'envisager des collaborations avec d'autres CRCM.

D'autre part, nous avons montré que les patients pouvaient être colonisés pendant de très longues périodes par la même souche d'*A. xylosoxidans*. Face à l'émergence de cette bactérie, il est nécessaire de s'interroger sur l'impact clinique de la colonisation par *A. xylosoxidans* sur la fonction respiratoire. En effet cette donnée est fondamentale car elle conditionnera la conduite thérapeutique à adopter (traitement ou non des primocolonisations par exemple). A l'issue de ce travail, nous pourrons étudier en particulier les données cliniques concernant les périodes pendant lesquelles les patients sont uniquement colonisés par *A. xylosoxidans*. A l'aide des techniques de MLST récemment décrites, nous pourrons également rechercher si un cluster est associé à un pouvoir pathogène particulier, par exemple la persistance des souches dans l'arbre respiratoire.

Enfin cette première étude a mis en évidence une fréquence élevée d'acquisition de résistances à la ceftazidime et aux carbapénèmes dans les souches des patients chroniquement colonisés. Les mécanismes de cette résistance acquise ne sont pas élucidés. Un précédent travail réalisé au laboratoire a mis en évidence la surexpression de mécanismes d'efflux présents chez *A. xylosoxidans* dans les souches présentant des résistances au méropénème. Il faudra maintenant s'intéresser aux molécules qui sont capables d'induire la surexpression de ces systèmes d'efflux, et qui sélectionnent potentiellement les mutants résistants chez les patients. D'autres mécanismes devront être étudiés également. Nous avons montré au laboratoire qu'il n'y avait pas d'acquisition de β -lactamases dans ces souches, et que le gène codant pour l'oxacilline constitutive n'était pas muté. Il faudra rechercher si une éventuelle surexpression de cette enzyme peut être en cause, et étudier par ailleurs des mécanismes de résistance par modification des PLP ou imperméabilité. La collection de souches constituée au laboratoire pourra nous permettre de rechercher les mécanismes en cause dans les souches

cliniques isolées successivement chez les patients avec par exemple le séquençage de 2 génomes complets de souches isogéniques d'*A. xylosoxidans* isolées à plusieurs années d'intervalle.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons mis en évidence différents réservoirs d'*A. xylosoxidans*, jouant le rôle de sources potentielles de contamination. En particulier il existe un risque d'acquisition d'*A. xylosoxidans* par les phénomènes de splash-back lors de l'utilisation de lavabos contaminés. A l'issue de ce travail nous pouvons donc proposer la mise en place de nouvelles recommandations de prévention aux patients atteints de mucoviscidose. A l'heure actuelle, les conseils d'hygiène formulés pour prévenir l'acquisition de *P. aeruginosa* à partir des lavabos consistent à verser alternativement de l'eau de Javel et du vinaigre pour détartrer et désinfecter les siphons. Cependant ces mesures ne sont probablement pas suffisamment efficaces contre les bactéries du biofilm présent dans les siphons. Des recommandations spécifiques concernant la conception et le nettoyage des lavabos devraient donc être formulées pour ces patients afin de prévenir le risque de contamination par splash-back : par exemple éviter la mise en place de robinets à forte pression situés directement au-dessus des siphons, éviter les grilles dans les lavabos mais utiliser des bondes. Celles-ci permettraient à la fois de limiter les éclaboussures lors de la toilette, tout en facilitant l'accès à la conduite d'évacuation d'eau pour éliminer régulièrement le biofilm à l'aide d'un goupillon par exemple. Nos travaux ont montré également qu'il existait un risque d'acquisition d'*A. xylosoxidans* lors des hospitalisations de malades fragilisés. Il serait donc nécessaire d'appliquer ces recommandations également à l'hôpital.

Par ailleurs il serait intéressant de réaliser les mêmes prélèvements domestiques chez des patients atteints de mucoviscidose non colonisés par *A. xylosoxidans*. Le suivi de ces patients permettrait d'observer la survenue éventuelle de colonisations par les souches domestiques. En cas de négativité, il sera intéressant de connaître les habitudes des patients (produits utilisés, protocoles de désinfection...).

A l'issue de ces travaux, nous n'avons pas été en mesure de déterminer si la prévalence d'*A. xylosoxidans* est particulièrement élevée à Dijon ou si elle résulte d'une meilleure détection de cet agent pathogène. Nous avons mis en évidence des réservoirs environnementaux en Bourgogne, mais ce travail ne constitue qu'une première approche. Il est nécessaire de réaliser des études à plus grande échelle dans d'autres régions de France et

du monde, représentant une plus grande diversité en termes de géographie et d'activités (agricoles, industrielles, élevage, etc...).

Des études sont nécessaires également pour mieux appréhender les relations entre l'homme, l'environnement, et le rôle éventuel des animaux dans la circulation de cet agent pathogène. En particulier une approche mutidisciplinaire serait particulièrement utile pour rechercher l'existence de liens entre l'émergence de cette bactérie chez l'homme et la présence de différents produits toxiques dans l'environnement qui exercent probablement une pression de sélection importante. A court terme, il serait intéressant de mettre en place des collaborations avec des équipes de microbiologie environnementale pour étudier des collections de souches environnementales d'*Achromobacter* avec les mêmes techniques que celles utilisées pour l'étude des souches cliniques.

BIBLIOGRAPHIE

IX-BIBLIOGRAPHIE

- Aanaes K.** (2013). "Bacterial sinusitis can be a focus for initial lung colonisation and chronic lung infection in patients with cystic fibrosis." *J Cyst Fibros* **12 Suppl 2**: S1-S20.
- Ahmed A. A. and Pineda R.** (2011). "*Alcaligenes xylosoxidans* contact lens-related keratitis. A case report and literature review." *Eye Contact Lens* **37**: 386-9.
- Aisenberg G., Rolston K. V. and Safdar A.** (2004). "Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989-2003)." *Cancer* **101**: 2134-40.
- Alhede M., Kragh K. N., Qvortrup K., Allesen-Holm M., van Gennip M., Christensen L. D., Jensen P. O., Nielsen A. K., Parsek M., Wozniak D., Molin S., Tolker-Nielsen T., Hoiby N., Givskov M. and Bjarnsholt T.** (2011). "Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm." *PLoS One* **6**: e27943.
- Ambler R. P.** (1980). "The structure of beta-lactamases." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**: 321-31.
- Atkinson R. M., Lipuma J. J., Rosenbluth D. B. and Dunne W. M., Jr.** (2006). "Chronic colonization with *Pandora apista* in cystic fibrosis patients determined by repetitive-element-sequence PCR." *J Clin Microbiol* **44**: 833-6.
- Avison M. B.** (2005). "New approaches to combating antimicrobial drug resistance." *Genome Biol* **6**: 243.
- Bador J., Amoureux L., Duez J. M., Drabowicz A., Siebor E., Llanes C. and Neuwirth C.** (2011). "First description of an RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM." *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 4912-4.
- Bador J., Amoureux L., Blanc E. and Neuwirth C.** (2013). "Innate Aminoglycoside Resistance of *Achromobacter xylosoxidans* is due to AxyXY-OprZ, an RND-Type Multidrug Efflux Pump." *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 603-5.
- Barnawal D., Bharti N., Maji D., Chanotiya C. S. and Kalra A.** (2012). "1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation." *Plant Physiol Biochem* **58**: 227-35.
- Barrado L., Branas P., Orellana M. A., Martinez M. T., Garcia G., Otero J. R. and Chaves F.** (2013). "Molecular characterization of *Achromobacter* isolates from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in Madrid, Spain." *J Clin Microbiol* **51**: 1927-30.
- Barton L. L. and Hoddy D. M.** (1993). "Osteomyelitis due to *Achromobacter xylosoxidans*." *Clin Infect Dis* **17**: 296-7.

- Besier S., Smaczny C., von Mallinckrodt C., Krahle A., Ackermann H., Brade V. and Wichelhaus T. A.** (2007). "Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease." *J Clin Microbiol* **45**: 168-72.
- Bidet P. and Bingen E.** (2012). "Apports des marqueurs moléculaires dans l'analyse des mécanismes d'acquisition et dans le suivi des infections nosocomiales." *mt pédiatrie* **15 (Supplément 1)**: 46-61.
- Bosshard P. P., Zbinden R., Abels S., Boddingtonhaus B., Altwegg M. and Bottger E. C.** (2006). "16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory." *J Clin Microbiol* **44**: 1359-66.
- Boukadida J., Monastiri K., Snoussi N., Jeddi M. and Berche P.** (1993). "Nosocomial neonatal meningitis by *Alcaligenes xylosoxidans* transmitted by aqueous eosin." *Pediatr Infect Dis J* **12**: 696-7.
- Brolund A., Haeggman S., Edquist P. J., Gezelius L., Olsson-Liljequist B., Wisell K. T. and Giske C. G.** (2010). "The DiversiLab system versus pulsed-field gel electrophoresis: characterisation of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*." *J Microbiol Methods* **83**: 224-30.
- Brusse H. J. and Auling G.** (2005). Genus II. *Achromobacter Yabuuchi and Yano 1981, 477^{VP} emend. Yabuuchi, Kawamura, Kosako and Ezaki 1998a, 1083. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley and G. M. Garrity. New York, NY, Springer. **2** (Part C): 658-662.
- Buckova M., Godocikova J., Zamocky M. and Polek B.** (2010). "Screening of bacterial isolates from polluted soils exhibiting catalase and peroxidase activity and diversity of their responses to oxidative stress." *Curr Microbiol* **61**: 241-7.
- Burns J. L., Emerson J., Stapp J. R., Yim D. L., Krzewinski J., Loudon L., Ramsey B. W. and Clausen C. R.** (1998). "Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States." *Clin Infect Dis* **27**: 158-63.
- Burns J. L., Van Dalfsen J. M., Shawar R. M., Otto K. L., Garber R. L., Quan J. M., Montgomery A. B., Albers G. M., Ramsey B. W. and Smith A. L.** (1999). "Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis." *J Infect Dis* **179**: 1190-6.
- Buzzetti R., Salvatore D., Baldo E., Forneris M. P., Lucidi V., Manunza D., Marinelli I., Messori B., Neri A. S., Raia V., Furnari M. L. and Mastella G.** (2009). "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 1. Mortality and survival studies in cystic fibrosis." *J Cyst Fibros* **8**: 229-37.
- Cescutti P., Cuzzi B., Liut G., Segonds C., Di Bonaventura G. and Rizzo R.** (2011). "A novel highly charged exopolysaccharide produced by two strains of *Stenotrophomonas*

- maltoophilia* recovered from patients with cystic fibrosis." Carbohydr Res **346**: 1916-23.
- Cheron M., Abachin E., Guerot E., El-Bez M. and Simonet M.** (1994). "Investigation of hospital-acquired infections due to *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* by DNA restriction fragment length polymorphism." J Clin Microbiol **32**: 1023-6.
- Chiron R., Marchandin H., Counil F., Jumas-Bilak E., Freydiere A. M., Bellon G., Husson M. O., Turck D., Bremont F., Chabanon G. and Segonds C.** (2005). "Clinical and microbiological features of *Inquilinus* sp. isolates from five patients with cystic fibrosis." J Clin Microbiol **43**: 3938-43.
- Chopra I., O'Neill A. J. and Miller K.** (2003). "The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria." Drug Resist Updat **6**: 137-45.
- Clermont D., Harmant C. and Bizet C.** (2001). "Identification of strains of *Alcaligenes* and *Agrobacterium* by a polyphasic approach." J Clin Microbiol **39**: 3104-9.
- Coenye T., Vandamme P. and LiPuma J. J.** (2002). "Infection by *Ralstonia* species in cystic fibrosis patients: identification of *R. pickettii* and *R. mannitolilytica* by polymerase chain reaction." Emerg Infect Dis **8**: 692-6.
- Coenye T., Vancanneyt M., Cnockaert M. C., Falsen E., Swings J. and Vandamme P.** (2003a). "*Kerstersia gyiorum* gen. nov., sp. nov., a novel *Alcaligenes faecalis*-like organism isolated from human clinical samples, and reclassification of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983 as *Achromobacter denitrificans* comb. nov." Int J Syst Evol Microbiol **53**: 1825-31.
- Coenye T., Vancanneyt M., Falsen E., Swings J. and Vandamme P.** (2003b). "*Achromobacter insolitus* sp. nov. and *Achromobacter spanius* sp. nov., from human clinical samples." Int J Syst Evol Microbiol **53**: 1819-24.
- Costerton J. W., Stewart P. S. and Greenberg E. P.** (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**: 1318-22.
- Courtney J. M., Bradley J., McCaughan J., O'Connor T. M., Shortt C., Bredin C. P., Bradbury I. and Elborn J. S.** (2007). "Predictors of mortality in adults with cystic fibrosis." Pediatr Pulmonol **42**: 525-32.
- Couture F., Lachapelle J. and Levesque R. C.** (1992). "Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D beta-lactamases." Mol Microbiol **6**: 1693-705.
- D'Amato R. F., Salemi M., Mathews A., Cleri D. J. and Reddy G.** (1988). "*Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) meningitis associated with a gunshot wound." J Clin Microbiol **26**: 2425-6.
- De Baets F., Schelstraete P., Van Daele S., Haerynck F. and Vaneechoutte M.** (2007). "*Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance." J Cyst Fibros **6**: 75-8.

- De Baets F., Schelstraete P., Haerynck F., Van Biervliet S., De Bruyne R., Franckx H. and Van Daele S.** (2013). "*Achromobacter xylosoxidans* induced bronchiolitis obliterans in cystic fibrosis." *Pediatr Pulmonol.* [epub] doi : 10.1002/ppul.22864
- Decre D., Arlet G., Danglot C., Lucet J. C., Fournier G., Bergogne-Berezin E. and Philippon A.** (1992). "A beta-lactamase-overproducing strain of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* isolated from a case of meningitis." *J Antimicrob Chemother* **30**: 769-79.
- Decre D., Arlet G., Bergogne-Berezin E. and Philippon A.** (1995). "Identification of a carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase in *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans*." *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 771-4.
- Degand N., Carbonnelle E., Dauphin B., Beretti J. L., Le Bourgeois M., Sermet-Gaudelus I., Segonds C., Berche P., Nassif X. and Ferroni A.** (2008). "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients." *J Clin Microbiol* **46**: 3361-7.
- Degand N. and Ruimy R.** (2012). "Intérêts et limites actuelles du MALDI-TOF en microbiologie clinique." *J Anti-infectieux* **14**: 159-167.
- Denton M., Todd N. J. and Littlewood J. M.** (1996). "Role of anti-pseudomonal antibiotics in the emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**: 402-5.
- Denton M. and Kerr K. G.** (1998). "Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*." *Clin Microbiol Rev* **11**: 57-80.
- Desai A. P., Stanley T., Atuan M., McKey J., Lipuma J. J., Rogers B. and Jerris R.** (2012). "Use of matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in a paediatric clinical laboratory for identification of bacteria commonly isolated from cystic fibrosis patients." *J Clin Pathol* **65**: 835-8.
- Doi Y., Poirel L., Paterson D. L. and Nordmann P.** (2008). "Characterization of a naturally occurring class D beta-lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*." *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1952-6.
- Doleans-Jordheim A., Cournoyer B., Bergeron E., Croize J., Salord H., Andre J., Mazoyer M. A., Renaud F. N. and Freney J.** (2009). "Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-PCR genotyping in various epidemiological situations." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**: 1105-11.
- Doring G. and Hoiby N.** (2004). "Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus." *J Cyst Fibros* **3**: 67-91.
- Doring G., Flume P., Heijerman H. and Elborn J. S.** (2012). "Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies." *J Cyst Fibros* **11**: 461-79.

- Duez J. M., Hadjait-Savioz M., Siebor E., Astruc K., Bador J., Pechinot A., Sixt N., Huet F. and Neuwirth C.** (2010). "In vitro synergistic activity of combined piperacillin and tobramycin against clinical strains of *Achromobacter xylosoxidans*." *J Chemother* **22**: 139-41.
- Duggan J. M., Goldstein S. J., Chenoweth C. E., Kauffman C. A. and Bradley S. F.** (1996). "*Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: report of four cases and review of the literature." *Clin Infect Dis* **23**: 569-76.
- Dunne W. M., Jr. and Maisch S.** (1995). "Epidemiological investigation of infections due to *Alcaligenes species* in children and patients with cystic fibrosis: use of repetitive-element-sequence polymerase chain reaction." *Clin Infect Dis* **20**: 836-41.
- Eickel V., Kahl B., Reinisch B., Dubbers A., Kuster P., Brandt C. and Spellerberg B.** (2009). "Emergence of respiratory *Streptococcus agalactiae* isolates in cystic fibrosis patients." *PLoS One* **4**: e4650.
- El Salabi A., Borra P. S., Toleman M. A., Samuelsen O. and Walsh T. R.** (2012). "Genetic and biochemical characterization of a novel metallo-beta-lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya." *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 2241-5.
- Emerson J., McNamara S., Buccat A. M., Worrell K. and Burns J. L.** (2010). "Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008." *Pediatr Pulmonol* **45**: 363-70.
- Farajzadeh Z. and Karbalaie-Heidari H. R.** (2012). "Isolation and characterization of a new *Achromobacter sp.* strain CAR1389 as a carbazole-degrading bacterium." *World J Microbiol Biotechnol* **28**: 3075-80.
- Farrell P. M., Shen G., Splaingard M., Colby C. E., Laxova A., Kosorok M. R., Rock M. J. and Mischler E. H.** (1997). "Acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis." *Pediatrics* **100**: E2.
- Farrell P. M., Li Z., Kosorok M. R., Laxova A., Green C. G., Collins J., Lai H. C., Rock M. J. and Splaingard M. L.** (2003). "Bronchopulmonary disease in children with cystic fibrosis after early or delayed diagnosis." *Am J Respir Crit Care Med* **168**: 1100-8.
- Farrell P. M., Collins J., Broderick L. S., Rock M. J., Li Z., Kosorok M. R., Laxova A., Gershan W. M. and Brody A. S.** (2009). "Association between mucoid *Pseudomonas* infection and bronchiectasis in children with cystic fibrosis." *Radiology* **252**: 534-43.
- Ferec C., Scotet V., Beucher J. and Corvol H.** (2012). "[Genetics and modifier genes, atypical and rare forms]." *Arch Pediatr* **19 Suppl 1**: S3-7.

- Fernandez-Olmos A., Garcia-Castillo M., Morosini M. I., Lamas A., Maiz L. and Canton R. (2012).** "MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients." *J Cyst Fibros* **11**: 59-62.
- Ferroni A., Sermet-Gaudelus I., Abachin E., Quesne G., Lenoir G., Berche P. and Gaillard J. L. (2002).** "Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center." *J Clin Microbiol* **40**: 3793-7.
- Fujioka M., Oka K., Kitamura R., Yakabe A. and Chikaaki N. (2008).** "*Alcaligenes xylosoxidans* cholecystitis and meningitis acquired during bathing procedures in a burn unit: a case report." *Ostomy Wound Manage* **54**: 48-53.
- Garcia-Castillo M., Maiz L., Morosini M. I., Rodriguez-Banos M., Suarez L., Fernandez-Olmos A., Baquero F., Canton R. and del Campo R. (2012).** "Emergence of a *mutL* mutation causing multilocus sequence typing-pulsed-field gel electrophoresis discrepancy among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient." *J Clin Microbiol* **50**: 1777-8.
- Gibson R. L., Burns J. L. and Ramsey B. W. (2003).** "Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **168**: 918-51.
- Gilligan P. H. (1991).** "Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis." *Clin Microbiol Rev* **4**: 35-51.
- Gomila M., Tvrzova L., Teshim A., Sedlacek I., Gonzalez-Escalona N., Zdrahal Z., Sedo O., Gonzalez J. F., Bennasar A., Moore E. R., Lalucat J. and Murialdo S. E. (2011).** "*Achromobacter marplatensis* sp. nov., isolated from a pentachlorophenol-contaminated soil." *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2231-7.
- Goss C. H., Otto K., Aitken M. L. and Rubenfeld G. D. (2002).** "Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **166**: 356-61.
- Graff G. R. and Burns J. L. (2002).** "Factors affecting the incidence of *Stenotrophomonas maltophilia* isolation in cystic fibrosis." *Chest* **121**: 1754-60.
- Grinwis M. E., Sibley C. D., Parkins M. D., Eshaghurshan C. S., Rabin H. R. and Surette M. G. (2010).** "Characterization of *Streptococcus milleri* group isolates from expectorated sputum of adult patients with cystic fibrosis." *J Clin Microbiol* **48**: 395-401.
- Hansen C. R., Pressler T., Hoiby N. and Gormsen M. (2006).** "Chronic infection with *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis patients; a retrospective case control study." *J Cyst Fibros* **5**: 245-51.
- Hansen C. R., Pressler T., Nielsen K. G., Jensen P. O., Bjarnsholt T. and Hoiby N. (2010).** "Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients." *J Cyst Fibros* **9**: 51-8.

- Hansen C. R., Pressler T., Ridderberg W., Johansen H. K. and Skov M. (2013).** "*Achromobacter species* in cystic fibrosis: Cross-infection caused by indirect patient-to-patient contact." *J Cyst Fibros.* [epub] doi : 10.1016/j.jcf.2013.05.004
- Hauser A. R., Jain M., Bar-Meir M. and McColley S. A. (2011).** "Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis." *Clin Microbiol Rev* **24**: 29-70.
- Hayes D., Jr., Murphy B. S., Kuhn R. J., Anstead M. I. and Feola D. J. (2009).** "Mucoid *Inquilinus limosus* in a young adult with cystic fibrosis." *Pediatr Pulmonol* **44**: 619-21.
- Healy M., Huong J., Bittner T., Lising M., Frye S., Raza S., Schrock R., Manry J., Renwick A., Nieto R., Woods C., Versalovic J. and Lupski J. R. (2005).** "Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR." *J Clin Microbiol* **43**: 199-207.
- Heijerman H., Westerman E., Conway S., Touw D. and Doring G. (2009).** "Inhaled medication and inhalation devices for lung disease in patients with cystic fibrosis: A European consensus." *J Cyst Fibros* **8**: 295-315.
- Henry R. L., Mellis C. M. and Petrovic L. (1992).** "Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis." *Pediatr Pulmonol* **12**: 158-61.
- Ho Y. N., Mathew D. C., Hsiao S. C., Shih C. H., Chien M. F., Chiang H. M. and Huang C. C. (2012).** "Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants." *J Hazard Mater* **219-220**: 43-9.
- Hogardt M., Ulrich J., Riehn-Kopp H. and Tummler B. (2009).** "EuroCareCF quality assessment of diagnostic microbiology of cystic fibrosis isolates." *J Clin Microbiol* **47**: 3435-8.
- Hoiby N., Flensburg E. W., Beck B., Friis B., Jacobsen S. V. and Jacobsen L. (1977).** "*Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis." *Scand J Respir Dis* **58**: 65-79.
- Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S. and Ciofu O. (2010).** "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." *Int J Antimicrob Agents* **35**: 322-32.
- Holmes B., Snell J. J. and Lapage S. P. (1977).** "Strains of *Achromobacter xylosoxidans* from clinical material." *J Clin Pathol* **30**: 595-601.
- Hota S., Hirji Z., Stockton K., Lemieux C., Dedier H., Wolfaardt G. and Gardam M. A. (2009).** "Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design." *Infect Control Hosp Epidemiol* **30**: 25-33.

- Hutchinson G. R., Parker S., Pryor J. A., Duncan-Skingle F., Hoffman P. N., Hodson M. E., Kaufmann M. E. and Pitt T. L.** (1996). "Home-use nebulizers: a potential primary source of *Burkholderia cepacia* and other colistin-resistant, gram-negative bacteria in patients with cystic fibrosis." *J Clin Microbiol* **34**: 584-7.
- Hutchison M. L., Bonell E. C., Poxton I. R. and Govan J. R.** (2000). "Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens." *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**: 73-7.
- Ilori M. O., Robinson G. K. and Adebuseye S. A.** (2008). "Degradation and mineralization of 2-chloro-, 3-chloro- and 4-chlorobiphenyl by a newly characterized natural bacterial strain isolated from an electrical transformer fluid-contaminated soil." *J Environ Sci (China)* **20**: 1250-7.
- Iordache L., Gaudelus J., Hubert D. and Launay O.** (2012). "[Vaccination of cystic fibrosis patients]." *Arch Pediatr* **19 Suppl 1**: S36-9.
- Iyobe S., Kusadokoro H., Takahashi A., Yomoda S., Okubo T., Nakamura A. and O'Hara K.** (2002). "Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain." *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2014-6.
- Jakobsen T. H., Hansen M. A., Jensen P. O., Hansen L., Riber L., Cockburn A., Kolpen M., Ronne Hansen C., Ridderberg W., Eickhardt S., Hansen M., Kerpedjiev P., Alhede M., Qvortrup K., Burmolle M., Moser C., Kuhl M., Ciofu O., Givskov M., Sorensen S. J., Hoiby N. and Bjarnsholt T.** (2013). "Complete genome sequence of the cystic fibrosis pathogen *Achromobacter xylosoxidans* NH44784-1996 complies with important pathogenic phenotypes." *PLoS One* **8**: e68484. doi : 10.1371/journal.pone.0068484
- Jaurin B. and Grundstrom T.** (1981). "AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 4897-901.
- Jensen E. T., Giwercman B., Ojeniyi B., Bangsberg J. M., Hansen A., Koch C., Fiehn N. E. and Hoiby N.** (1997). "Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis and the possible role of contamination by dental equipment." *J Hosp Infect* **36**: 117-22.
- Jha P. and Kumar A.** (2009). "Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant." *Microb Ecol* **58**: 179-88.
- Johansen H. K., Norregaard L., Gotzsche P. C., Pressler T., Koch C. and Hoiby N.** (2004). "Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients: a marker of therapeutic success?-A 30-year cohort study of survival in Danish CF patients after onset of chronic *P. aeruginosa* lung infection." *Pediatr Pulmonol* **37**: 427-32.

- Jorgensen I. M., Johansen H. K., Frederiksen B., Pressler T., Hansen A., Vandamme P., Hoiby N. and Koch C.** (2003). "Epidemic spread of *Pandoraea apista*, a new pathogen causing severe lung disease in cystic fibrosis patients." *Pediatr Pulmonol* **36**: 439-46.
- Kanellopoulou M., Pournaras S., Iglezos H., Skarmoutsou N., Papafrangas E. and Maniatis A. N.** (2004). "Persistent colonization of nine cystic fibrosis patients with an *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* clone." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**: 336-9.
- Kaur M., Ray P., Bhatta M. and Sharma M.** (2009). "Epidemiological typing of clinical isolates of *Achromobacter xylosoxidans*: comparison of phenotypic and genotypic methods." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**: 1023-32.
- Kerem B., Rommens J. M., Buchanan J. A., Markiewicz D., Cox T. K., Chakravarti A., Buchwald M. and Tsui L. C.** (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis." *Science* **245**: 1073-80.
- Kidd T. J., Ramsay K. A., Hu H., Bye P. T., Elkins M. R., Grimwood K., Harbour C., Marks G. B., Nissen M. D., Robinson P. J., Rose B. R., Sloots T. P., Wainwright C. E. and Bell S. C.** (2009). "Low rates of *Pseudomonas aeruginosa* misidentification in isolates from cystic fibrosis patients." *J Clin Microbiol* **47**: 1503-9.
- Kolbert C. P. and Persing D. H.** (1999). "Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens." *Curr Opin Microbiol* **2**: 299-305.
- Kolpen M., Hansen C. R., Bjarnsholt T., Moser C., Christensen L. D., van Gennip M., Ciofu O., Mandsberg L., Kharazmi A., Doring G., Givskov M., Hoiby N. and Jensen P. O.** (2009). "Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis." *Thorax* **65**: 57-62.
- Krzewinski J. W., Nguyen C. D., Foster J. M. and Burns J. L.** (2001). "Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis." *J Clin Microbiol* **39**: 3597-602.
- Lambiase A., Raia V., Del Pezzo M., Sepe A., Carnovale V. and Rossano F.** (2006). "Microbiology of airway disease in a cohort of patients with cystic fibrosis." *BMC Infect Dis* **6**: 4.
- Lambiase A., Catania M. R., Del Pezzo M., Rossano F., Terlizzi V., Sepe A. and Raia V.** (2011). "*Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **30**: 973-80.
- Leung M. K., Rachakonda L., Weill D. and Hwang P. H.** (2008). "Effects of sinus surgery on lung transplantation outcomes in cystic fibrosis." *Am J Rhinol* **22**: 192-6.
- Levesque R., Letarte R. and Pechere J. C.** (1983). "Comparative study of the beta-lactamase activity found in *Achromobacter*." *Can J Microbiol* **29**: 819-26.

- Li X., Hu Y., Gong J., Lin Y., Johnstone L., Rensing C. and Wang G.** (2012). "Genome sequence of the highly efficient arsenite-oxidizing bacterium *Achromobacter arsenitoxydans* SY8." *J Bacteriol* **194**: 1243-4.
- Li Z., Kosorok M. R., Farrell P. M., Laxova A., West S. E., Green C. G., Collins J., Rock M. J. and Splaingard M. L.** (2005). "Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis." *JAMA* **293**: 581-8.
- Liu L., Coenye T., Burns J. L., Whitby P. W., Stull T. L. and LiPuma J. J.** (2002). "Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients." *J Clin Microbiol* **40**: 1210-3.
- Looney W. J., Narita M. and Muhlemann K.** (2009). "*Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen." *Lancet Infect Dis* **9**: 312-23.
- Lowe C., Willey B., O'Shaughnessy A., Lee W., Lum M., Pike K., Larocque C., Dedier H., Dales L., Moore C. and McGeer A.** (2012). "Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated handwashing sinks." *Emerg Infect Dis* **18**: 1242-7.
- Magni A., Trancassini M., Varesi P., Iebba V., Curci A., Pecoraro C., Cimino G., Schippa S. and Quattrucci S.** (2010). "*Achromobacter xylosoxidans* genomic characterization and correlation of randomly amplified polymorphic DNA profiles with relevant clinical features [corrected] of cystic fibrosis patients." *J Clin Microbiol* **48**: 1035-9.
- Mahenthalingam E., Urban T. A. and Goldberg J. B.** (2005). "The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex." *Nat Rev Microbiol* **3**: 144-56.
- Maiden M. C., Bygraves J. A., Feil E., Morelli G., Russell J. E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D. A., Feavers I. M., Achtman M. and Spratt B. G.** (1998). "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3140-5.
- Mantovani R. P., Levy C. E. and Yano T.** (2012). "A heat-stable cytotoxic factor produced by *Achromobacter xylosoxidans* isolated from Brazilian patients with CF is associated with in vitro increased proinflammatory cytokines." *J Cyst Fibros* **11**: 305-11.
- Marko D. C., Saffert R. T., Cunningham S. A., Hyman J., Walsh J., Arbefeville S., Howard W., Pruessner J., Safwat N., Cockerill F. R., Bossler A. D., Patel R. and Richter S. S.** (2012). "Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients." *J Clin Microbiol* **50**: 2034-9.

- Maselli J. H., Sontag M. K., Norris J. M., MacKenzie T., Wagener J. S. and Accurso F. J.** (2003). "Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis identified by newborn screening." *Pediatr Pulmonol* **35**: 257-62.
- McBain A. J., Bartolo R. G., Catrenich C. E., Charbonneau D., Ledder R. G., Price B. B. and Gilbert P.** (2003). "Exposure of sink drain microcosms to triclosan: population dynamics and antimicrobial susceptibility." *Appl Environ Microbiol* **69**: 5433-42.
- McCaughey G., Gilpin D. F., Schneiders T., Hoffman L. R., McKeivitt M., Elborn J. S. and Tunney M. M.** (2013). "Fosfomycin and tobramycin in combination downregulate nitrate reductase genes *narG* and *narH*, resulting in increased activity against *Pseudomonas aeruginosa* under anaerobic conditions." *Antimicrob Agents Chemother*. [epub] doi : 10.1128/AAC.00750-13.
- Mensah K., Philippon A., Richard C. and Nevot P.** (1990). "Susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subspecies *xylosoxydans* to beta-lactam antibiotics." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**: 405-9.
- Moissenet D., Baculard A., Valcin M., Marchand V., Tournier G., Garbarg-Chenon A. and Vu-Thien H.** (1997). "Colonization by *Alcaligenes xylosoxydans* in children with cystic fibrosis: a retrospective clinical study conducted by means of molecular epidemiological investigation." *Clin Infect Dis* **24**: 274-5.
- Munck A., Dhondt J. L., Sahler C. and Roussey M.** (2008). "Implementation of the French nationwide cystic fibrosis newborn screening program." *J Pediatr* **153**: 228-33, 233 e1.
- Neuwirth C., Freby C., Ogier-Desserrey A., Perez-Martin S., Houzel A., Pechinot A., Duez J. M., Huet F. and Siebor E.** (2006). "VEB-1 in *Achromobacter xylosoxydans* from cystic fibrosis patient, France." *Emerg Infect Dis* **12**: 1737-9.
- O'Sullivan B. P. and Freedman S. D.** (2009). "Cystic fibrosis." *Lancet* **373**: 1891-904.
- Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F. and Blazquez J.** (2000). "High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection." *Science* **288**: 1251-4.
- Oliver A., Baquero F. and Blazquez J.** (2002). "The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants." *Mol Microbiol* **43**: 1641-50.
- Ouellette M., Bissonnette L. and Roy P. H.** (1987). "Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7378-82.
- Ozer K., Kankaya Y., Baris R., Bektas C. I. and Kocer U.** (2012). "Calcaneal osteomyelitis due to *Achromobacter xylosoxydans*: a case report." *J Infect Chemother* **18**: 915-8.
- Packer L. and Vishniac W.** (1955). "Chemosynthetic fixation of carbon dioxide and characteristics of hydrogenase in resting cell suspensions of *Hydrogenomonas ruhlandii* nov. spec." *J Bacteriol* **70**: 216-23.

- Papalia M., Almuzara M., Cejas D., Traglia G., Ramirez M. S., Galanternik L., Vay C., Gutkind G. and Radice M.** (2013). "OXA-258 from *Achromobacter ruhlandii*: a species-specific marker." *J Clin Microbiol* **51**: 1602-5.
- Patel J. B.** (2001). "16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory." *Mol Diagn* **6**: 313-21.
- Pereira R. H., Carvalho-Assef A. P., Albano R. M., Folescu T. W., Jones M. C., Leao R. S. and Marques E. A.** (2011). "*Achromobacter xylosoxidans*: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients." *J Clin Microbiol* **49**: 3649-51.
- Philippon A., Mensah K., Fournier G. and Freney J.** (1990). "Two resistance phenotypes to beta-lactams of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* in relation to beta-lactamase types." *J Antimicrob Chemother* **25**: 698-700.
- Pinot C., Deredjian A., Nazaret S., Brothier E., Cournoyer B., Segonds C. and Favre-Bonte S.** (2011). "Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: a rapid and efficient procedure." *J Appl Microbiol* **111**: 1185-93.
- Pitchford K. C., Corey M., Highsmith A. K., Perlman R., Bannatyne R., Gold R., Levison H. and Ford-Jones E. L.** (1987). "*Pseudomonas species* contamination of cystic fibrosis patients' home inhalation equipment." *J Pediatr* **111**: 212-6.
- Qin X., Razia Y., Johnson J. R., Stapp J. R., Boster D. R., Tsosie T., Smith D. L., Braden C. R., Gay K., Angulo F. J. and Tarr P. I.** (2006). "Ciprofloxacin-resistant gram-negative bacilli in the fecal microflora of children." *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3325-9.
- Rabin H. R. and Surette M. G.** (2012). "The cystic fibrosis airway microbiome." *Curr Opin Pulm Med* **18**: 622-7.
- Reina J., Antich M., Siquier B. and Alomar P.** (1988). "Nosocomial outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* associated with a diagnostic contrast solution." *J Clin Pathol* **41**: 920-1.
- Reisin I. L., Prat A. G., Abraham E. H., Amara J. F., Gregory R. J., Ausiello D. A. and Cantiello H. F.** (1994). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel." *J Biol Chem* **269**: 20584-91.
- Reverdy M. E., Freney J., Fleurette J., Coulet M., Surgot M., Marmet D. and Ploton C.** (1984). "Nosocomial colonization and infection by *Achromobacter xylosoxidans*." *J Clin Microbiol* **19**: 140-3.
- Reychler G., Dupont C. and Dubus J. C.** (2007). "[Disinfection of devices for nebulization: stakes, difficulties, and improvement proposals]." *Rev Mal Respir* **24**: 1351-61.

- Riccio M. L., Pallecchi L., Fontana R. and Rossolini G. M.** (2001). "In70 of plasmid pAX22, a *bla*(VIM-1)-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette." *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1249-53.
- Ridderberg W., Bendstrup K. E., Olesen H. V., Jensen-Fangel S. and Nørskov-Lauritsen N.** (2011). "Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment." *J Cyst Fibros* **10**: 466-9.
- Ridderberg W., Wang M. and Nørskov-Lauritsen N.** (2012). "Multilocus sequence analysis of isolates of *Achromobacter* from patients with cystic fibrosis reveals infecting species other than *Achromobacter xylosoxidans*." *J Clin Microbiol* **50**: 2688-94.
- Roby B. B., McNamara J., Finkelstein M. and Sidman J.** (2008). "Sinus surgery in cystic fibrosis patients: comparison of sinus and lower airway cultures." *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **72**: 1365-9.
- Romano L., Bellodi S., Lugani F. and Manno G.** (2003). "To the editor: *Alcaligenes* as a pathogen in airways chronic infection in cystic fibrosis." *Pediatr Pulmonol* **35**: 412-3.
- Rosenfeld M., Emerson J., McNamara S., Thompson V., Ramsey B. W., Morgan W. and Gibson R. L.** (2012). "Risk factors for age at initial *Pseudomonas* acquisition in the cystic fibrosis epic observational cohort." *J Cyst Fibros* **11**: 446-53.
- Roux A. L., Catherinot E., Ripoll F., Soismier N., Macheras E., Ravilly S., Bellis G., Vibet M. A., Le Roux E., Lemonnier L., Gutierrez C., Vincent V., Fauroux B., Rottman M., Guillemot D. and Gaillard J. L.** (2009). "Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France." *J Clin Microbiol* **47**: 4124-8.
- Saiman L., Chen Y., Tabibi S., San Gabriel P., Zhou J., Liu Z., Lai L. and Whittier S.** (2001). "Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis." *J Clin Microbiol* **39**: 3942-5.
- Saiman L. and Siegel J.** (2004). "Infection control in cystic fibrosis." *Clin Microbiol Rev* **17**: 57-71.
- Saiman L.** (2011). "Infection prevention and control in cystic fibrosis." *Curr Opin Infect Dis* **24**: 390-5.
- Salvador-Garcia C., Yague-Guirao G., Pastor-Vivero M. D. and Saez-Nieto J. A.** (2013). "Chronic colonization of *Inquilinus limosus* in a patient with cystic fibrosis: first report in Spain." *Enferm Infec Microbiol Clin* **31**: 414-5.
- Sanschagrin F., Couture F. and Levesque R. C.** (1995). "Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases." *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 887-93.
- Sarkar A., Kazy S. K. and Sar P.** (2013). "Characterization of arsenic resistant bacteria from arsenic rich groundwater of West Bengal, India." *Ecotoxicology* **22**: 363-76.

- Shibata N., Doi Y., Yamane K., Yagi T., Kurokawa H., Shibayama K., Kato H., Kai K. and Arakawa Y.** (2003). "PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron." *J Clin Microbiol* **41**: 5407-13.
- Siebor E., Llanes C., Lafon I., Ogier-Desserrey A., Duez J. M., Pechinot A., Caillot D., Grandjean M., Sixt N. and Neuwirth C.** (2007). "Presumed pseudobacteremia outbreak resulting from contamination of proportional disinfectant dispenser." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**: 195-8.
- Silva I. N., Ferreira A. S., Becker J. D., Zlosnik J. E., Speert D. P., He J., Mil-Homens D. and Moreira L. M.** (2011). "Mucoid morphotype variation of *Burkholderia multivorans* during chronic cystic fibrosis lung infection is correlated with changes in metabolism, motility, biofilm formation and virulence." *Microbiology* **157**: 3124-37.
- Singh N. S. and Singh D. K.** (2011). "Biodegradation of endosulfan and endosulfan sulfate by *Achromobacter xylosoxidans* strain C8B in broth medium." *Biodegradation* **22**: 845-57.
- Sofianou D., Markogiannakis A., Metzidie E., Pournaras S. and Tsakris A.** (2005). "VIM-2 metallo-beta-lactamase in *Achromobacter xylosoxidans* in Europe." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**: 854-5.
- Spear J. B., Fuhrer J. and Kirby B. D.** (1988). "*Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) bacteremia associated with a well-water source: case report and review of the literature." *J Clin Microbiol* **26**: 598-9.
- Spicuzza L., Sciuto C., Vitaliti G., Di Dio G., Leonardi S. and La Rosa M.** (2009). "Emerging pathogens in cystic fibrosis: ten years of follow-up in a cohort of patients." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**: 191-195.
- Spilker T., Vandamme P. and Lipuma J. J.** (2012). "A multilocus sequence typing scheme implies population structure and reveals several putative novel *Achromobacter* species." *J Clin Microbiol* **50**: 3010-5.
- Spilker T., Vandamme P. and Lipuma J. J.** (2013). "Identification and distribution of *Achromobacter species* in cystic fibrosis." *J Cyst Fibros* **12**: 298-301.
- Stanojevic S., Ratjen F., Stephens D., Lu A., Yau Y., Tullis E. and Waters V.** (2013). "Factors influencing the acquisition of *Stenotrophomonas maltophilia* infection in cystic fibrosis patients." *J Cyst Fibros*. [epub]. doi : 10.1016/j.jcf.2013.05.009.
- Starner T. D., Zhang N., Kim G., Apicella M. A. and McCray P. B., Jr.** (2006). "*Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **174**: 213-20.
- Stern M. J., Ames G. F., Smith N. H., Robinson E. C. and Higgins C. F.** (1984). "Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome." *Cell* **37**: 1015-26.

- Swart J., Volker-Dieben H. J. and Reichert-Thoen J. W.** (1999). "*Alcaligenes xylosoxidans* endophthalmitis 8 months after cataract extraction." *Am J Ophthalmol* **127**: 345-6.
- Talmaciu I., Varlotta L., Mortensen J. and Schidlow D. V.** (2000). "Risk factors for emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis." *Pediatr Pulmonol* **30**: 10-5.
- Tan K., Conway S. P., Brownlee K. G., Etherington C. and Peckham D. G.** (2002). "*Alcaligenes* infection in cystic fibrosis." *Pediatr Pulmonol* **34**: 101-4.
- Tena D., Carranza R., Barbera J. R., Valdezate S., Garrancho J. M., Arranz M. and Saez-Nieto J. A.** (2005). "Outbreak of long-term intravascular catheter-related bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**: 727-32.
- Tena D., Gonzalez-Praetorius A., Perez-Balsalobre M., Sancho O. and Bisquert J.** (2008). "Urinary tract infection due to *Achromobacter xylosoxidans*: report of 9 cases." *Scand J Infect Dis* **40**: 84-7.
- Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H. and Swaminathan B.** (1995). "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." *J Clin Microbiol* **33**: 2233-9.
- Traglia G. M., Almuzara M., Merkier A. K., Papalia M., Galanternik L., Radice M., Vay C., Centron D. and Ramirez M. S.** (2013). "Distribution of Allelic Variants of the Chromosomal Gene *bla* in *Achromobacter xylosoxidans* Clinical Isolates." *Curr Microbiol* **67**: 596-600.
- Trajanovska S., Britz M. L. and Bhawe M.** (1997). "Detection of heavy metal ion resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site." *Biodegradation* **8**: 113-24.
- Turel O., Kavuncuoglu S., Hosaf E., Ozbek S., Aldemir E., Uygur T., Hatipoglu N. and Siraneci R.** (2013). "Bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* in neonates: clinical features and outcome." *Braz J Infect Dis* **17**: 450-4.
- Turton J. F., Mustafa N., Shah J., Hampton C. V., Pike R. and Kenna D. T.** (2011). "Identification of *Achromobacter xylosoxidans* by detection of the *bla*(OXA-114-like) gene intrinsic in this species." *Diagn Microbiol Infect Dis* **70**: 408-11.
- Van Daele S., Verhelst R., Claeys G., Verschraegen G., Franckx H., Van Simaey L., de Ganck C., De Baets F. and Vanechoutte M.** (2005). "Shared genotypes of *Achromobacter xylosoxidans* strains isolated from patients at a cystic fibrosis rehabilitation center." *J Clin Microbiol* **43**: 2998-3002.

- Van Hal S., Stark D., Marriott D. and Harkness J.** (2008). "*Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* prosthetic aortic valve infective endocarditis and aortic root abscesses." *J Med Microbiol* **57**: 525-7.
- Vandamme P., Moore E. R., Cnockaert M., De Brandt E., Svensson-Stadler L., Houf K., Spilker T. and Lipuma J. J.** (2012). "*Achromobacter animicus* sp. nov., *Achromobacter mucicolens* sp. nov., *Achromobacter pulmonis* sp. nov. and *Achromobacter spiritinus* sp. nov., from human clinical samples." *Syst Appl Microbiol* **36**: 1-10.
- Vandamme P., Moore E. R., Cnockaert M., Peeters C., Svensson-Stadler L., Houf K., Spilker T. and Lipuma J. J.** (2013). "Classification of *Achromobacter* genogroups 2, 5, 7 and 14 as *Achromobacter insuavis* sp. nov., *Achromobacter aegrifaciens* sp. nov., *Achromobacter anxifer* sp. nov. and *Achromobacter dolens* sp. nov., respectively." *Syst Appl Microbiol* **36**: 474-482.
- Versalovic J., Koeuth T. and Lupski J. R.** (1991). "Distribution of repetitive DNA sequences in *eubacteria* and application to fingerprinting of bacterial genomes." *Nucleic Acids Res* **19**: 6823-31.
- Vu-Thien H., Darbord J. C., Moissenet D., Dulot C., Dufourcq J. B., Marsol P. and Garbarg-Chenon A.** (1998). "Investigation of an outbreak of wound infections due to *Alcaligenes xylosoxidans* transmitted by chlorhexidine in a burns unit." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**: 724-6.
- Wang M., Ridderberg W., Hansen C. R., Hoiby N., Jensen-Fangel S., Olesen H. V., Skov M., Lemming L. E., Pressler T., Johansen H. K. and Nørskov-Lauritsen N.** (2013). "Early treatment with inhaled antibiotics postpones next occurrence of *Achromobacter* in cystic fibrosis." *J Cyst Fibros.* [epub] 10.1016/j.jcf.2013.04.013
- Waters V., Yau Y., Prasad S., Lu A., Atenafu E., Crandall I., Tom S., Tullis E. and Ratjen F.** (2011). "*Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: serologic response and effect on lung disease." *Am J Respir Crit Care Med* **183**: 635-40.
- Waters V.** (2012). "New treatments for emerging cystic fibrosis pathogens other than *Pseudomonas*." *Curr Pharm Des* **18**: 696-725.
- Wellington E. M., Boxall A. B., Cross P., Feil E. J., Gaze W. H., Hawkey P. M., Johnson-Rollings A. S., Jones D. L., Lee N. M., Otten W., Thomas C. M. and Williams A. P.** (2013). "The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria." *Lancet Infect Dis* **13**: 155-65.
- Wintermeyer S. M. and Nahata M. C.** (1996). "*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* in children with chronic otorrhea." *Otolaryngol Head Neck Surg* **114**: 332-4.
- Wirsing von König C. H., Riffelmann M. and Coenye T.** (2011). *Bordetella* and Related Genera. Manual of Clinical Microbiology. J. Versalovic, K. C. Carroll, J. H. Jorgensen et al. Washington, DC, ASM Press. **1**: 739-750.

- Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K. C., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T., Botzenhart K., Yankaskas J. R., Randell S., Boucher R. C. and Doring G.** (2002). "Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients." *J Clin Invest* **109**: 317-25.
- Wu X. Q., Yuan W. M., Tian X. J., Fan B., Fang X., Ye J. R. and Ding X. L.** (2013). "Specific and functional diversity of endophytic bacteria from pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* with different virulence." *Int J Biol Sci* **9**: 34-44.
- Wuilleme X.** (2003). "Etude de la sensibilité aux antibiotiques de 16 souches d'*Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* isolées de patients atteints de mucoviscidose, à Nantes de 1998 à 2001." Mémoire de Diplôme d'études spécialisées de Biologie Médicale. Université de Nantes. Faculté de Pharmacie: 125 Direction J. Caillon.
- Yabuuchi E. and Oyama A.** (1971). "*Achromobacter xylosoxidans* n. sp. from human ear discharge." *Jpn J Microbiol* **15**: 477-81.
- Yabuuchi E. and Yano I.** (1981). "*Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev." *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**: 477-478.
- Yabuuchi E., Kawamura Y., Kosako Y. and Ezaki T.** (1998). "Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Ruger and Tan) comb. nov." *Microbiol Immunol* **42**: 429-38.
- Yamamoto M., Nagao M., Hotta G., Matsumura Y., Matsushima A., Ito Y., Takakura S. and Ichiyama S.** (2012). "Molecular characterization of IMP-type metallo-beta-lactamases among multidrug-resistant *Achromobacter xylosoxidans*." *J Antimicrob Chemother* **67**: 2110-3.
- Zbinden A., Bottger E. C., Bosshard P. P. and Zbinden R.** (2007). "Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of gram-negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing." *J Clin Microbiol* **45**: 2270-3.

X-ANNEXES

X-ANNEXES

Annexe 1 : Souches types décrites dans le genre *Achromobacter*. Origine et dénomination dans les différentes collections.

<i>Espèce et souche type</i>	<i>Origine</i>	<i>Référence</i>
<i>A. ruhlandii</i> CIP 77.26 ^T ATCC 15749 ^T LMG 1866 ^T CCUG 38886 ^T	Sol	(Packer and Vishniac 1955)
<i>A. xylosoxidans</i> CIP 71.32 ^T ATCC 27061 LMG 1863 ^T	Oreille	(Yabuuchi and Oyama 1971)
<i>A. denitrificans</i> CIP 77.15 ^T ATCC 15173 ^T LMG 1231 ^T CCUG 407 ^T	Sol	(Rüger and Tan 1983)
<i>A. piechaudii</i> CIP 60.75 ^T ATCC 43552 ^T LMG 1873 ^T CCUG 724 ^T	Pharynx	(Kiredjian <i>et al.</i> 1986)
<i>A. spanius</i> LMG 5911 ^T CIP 108199 ^T CCUG 47062 ^T	Sang	(Coenye <i>et al.</i> 2003b)
<i>A. insolitus</i> LMG 6003 ^T CIP 108202 ^T CCUG 47057 ^T	Plaie	(Coenye <i>et al.</i> 2003b)
<i>A. marplatensis</i> LMG 26219 ^T CCUG 56371 ^T	Sol	(Gomila <i>et al.</i> 2011)

<i>A. mucicolens</i> LMG 26685 ^T CCUG 61961 ^T	Expectoration	(Vandamme <i>et al.</i> 2012)
<i>A. animicus</i> LMG 26690 ^T CCUG 61966 ^T	Expectoration	(Vandamme <i>et al.</i> 2012)
<i>A. spiritinus</i> LMG 26692 ^T CCUG 61968 ^T	Expectoration	(Vandamme <i>et al.</i> 2012)
<i>A. pulmonis</i> LMG 26696 ^T CCUG 61972 ^T	Expectoration (mucoviscidose)	(Vandamme <i>et al.</i> 2012)
<i>A. insuavis</i> LMG 26845 ^T CCUG 62426 ^T	Expectoration	(Vandamme <i>et al.</i> 2013)
<i>A. aegrifaciens</i> LMG 26852 ^T CCUG 62438 ^T	Expectoration	(Vandamme <i>et al.</i> 2013)
<i>A. anxifer</i> LMG 26857 ^T CCUG 62444 ^T	Expectoration (mucoviscidose)	(Vandamme <i>et al.</i> 2013)
<i>A. dolens</i> LMG 26840 ^T CCUG 62421 ^T	Expectoration	(Vandamme <i>et al.</i> 2013)

DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Leibniz, Allemagne ; CIP : Collection bactérienne de l'Institut Pasteur, Paris, France; LMG : Bacteria Collection Laboratorium voor Microbiologie Gent, Belgique. ATCC, American Type Culture Collection, USA; CCUG, Culture Collection University of Gothenburg Göteborg Suède.

Annexe 2 : Antibiotiques les plus cités dans ce travail (liste alphabétique et famille).

<i>Antibiotiques</i>	<i>Abréviation</i>	<i>Famille d'antibiotique, classe</i>
Acide clavulanique		Inhibiteur de β -lactamase
Acide nalidixique	NA	Quinolone
Amikacine	AN	Aminoglycoside (aminoside)
Amoxicilline	AMX	β -lactamine, aminopénicilline
Aztréonam	ATM	β -lactamine, monobactam
Céfalotine	CF	β -lactamine, céphalosporine de 1 ^{ère} génération
Céfépime	FEP	β -lactamine, céphalosporine de 3 ^e génération
Céfotaxime	CTX	β -lactamine, céphalosporine de 3 ^e génération
Céfoxitine	FOX	β -lactamine, céphamycine
Ceftazidime	CAZ	β -lactamine, céphalosporine de 3 ^e génération
Céfuroxime	CXM	β -lactamine, céphalosporine de 3 ^e génération
Ciprofloxacine	CIP	Fluoroquinolone
Colistine	CS	Polymyxine
Doripénème	DOR	β -lactamine, carbapénème
Doxycycline	DO	Tétracycline
Gentamicine	G	Aminoglycoside (aminoside)
Imipénème	IPM	β -lactamine, carbapénème
Kanamycine	K	Aminoglycoside (aminoside)
Méropénème	MEM	β -lactamine, carbapénème
Netilmicine	NT	Aminoglycoside (aminoside)
Ofloxacine	OFX	Fluoroquinolone
Pipéracilline	PIP	β -lactamine, uréidopénicilline
Tazobactam		Inhibiteur de β -lactamase
Ticarcilline	TIC	β -lactamine, carboxypénicilline
Tobramycine	TM	Aminoglycoside (aminoside)
Triméthoprim + sulfaméthoxazole	SXT	Diaminopyrimidine + sulfamide
Vancomycine	VA	Glycopeptide

Annexe 3 : Liens internet vers les rapports des différents registres de la mucoviscidose mentionnés dans ce travail :

France (2011) :

http://www.vaincrelamuco.org/e_upload/div/registre_francais_mucoviscidose_2011_15.03.13.pdf

Australie (2011) : http://www.cysticfibrosis.org.au/media/wysiwyg/CF-Australia/medical-documents/ACFDR_2011/ACFDR_2011_Report.pdf

Irlande (2011): http://www.cfri.ie/docs/annual_reports/CFRI2011.pdf

Canada (2011) :

<http://www.cysticfibrosis.ca/assets/files/pdf/Registry2011FINALOnlineEN.pdf>

Europe (2008-2009) :

http://www.ecfs.eu/files/webfm/webfiles/File/ecfs_registry/ECFSR_Report0809_v32012.pdf/

Danemark (2011):

http://www.cfonderzoek.nl/bestanden/cf-registratie/report_dutch_cf_registry_2011.pdf

Royaume-Uni (2010) :

<http://www.brit-thoracic.org.uk/Portals/0/Clinical%20Information/Cystic%20Fibrosis/UK%20CF%20Registry%20-%20Annual%20Data%20Report%202010.pdf>

Allemagne (2011) :

http://muko.info/fileadmin/redaktion/Forschung/Muko-Institut/QM_CF_Einrichtungen/Mukoviszidose_2011_mit_Verlinkungen-gross.pdf

	18	70	74
OXA-114a	MTVRRRLSCALGAA	LSL	SALGGGPVQAAVLCTVVADAADGRILFQQGTQQACAERYTPASTFKLAIALMGADAGILQGPHEPVWNYQPAYPDWGGDAWRQ
OXA-114b	-----	-----	-----
OXA-114c	-----	-----	-----
OXA-114d	-----	-----	-----
OXA-114e	-----	-----	-----
OXA-114f	-----	-----	-----
OXA-114g	-----	-----	-----
OXA-114h	-----	-----	-----
OXA-114i	-----	-----	-----
OXA-114j	-----	-----	-----
OXA-114k	-----	-----	-----
OXA-114l	-----	-----	-----
OXA-114m	-----	-----	-----
OXA-114n	-----	-----	-----
OXA-114p	-----	-----	-----
OXA-114q	-----	-----	-----
OXA-114r	-----	-----	-----
OXA-114s	-----	-----	-----
OXA-114t	-----	-----	-----
OXA-114u	-----	-----	-----
OXA-114v	-----	-----	-----

- : résidu identique à la séquence de référence. Les nombres indiquent la position des résidus selon la nomenclature des β -lactamases de classe D (Couture *et al.* 1992). Les séquences conservées chez les autres oxacillinases sont surlignées (Sanschagrin *et al.* 1995).

	118	128	144	155	164	176	182	183							
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓							
OXA-114a	PTDPA	WIKY	SVVWYS	QLTAK	ALGQD	RFQRY	TS	AFGYGN	ADVSGEPG	KHNGTDGAW	IISSLRIS	PLEQLA	FLR	KL	VNRQLP
OXA-114b	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114c	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114d	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114e	-----	-----	-----	-----	M	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114f	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114g	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	R	-----	-----	-----	-----	V	-----
OXA-114h	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114i	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	V	-----
OXA-114j	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114k	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	V	-----
OXA-114l	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114m	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114n	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	R	-----
OXA-114p	-----	Q	-----	-----	I	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	R	-----
OXA-114q	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114r	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114s	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OXA-114t	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	V	-----
OXA-114u	-----	Q	-----	-----	I	-----	-----	A	-----	-----	-----	-----	-----	R	E
OXA-114v	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	R	-----

Annexe 4 : Alignement des séquences protéiques des différents variants de l'enzyme OXA-114 suite (2/ 3).

- : résidu identique à la séquence de référence. Les nombres indiquent la position des résidus selon la nomenclature des β -lactamases de classe D (Couture *et al.* 1992). Les séquences conservées chez les autres oxacillinasés sont surlignées (Sanschagrin *et al.* 1995).

	200	205	214	216		288		306						
	↓	↓	↓	↓		↓		↓						
OXA-114a	VKAAAYELA	ENLFEAG	QADGWRL	YGKTGTG	SPGSNGV	YTAANAYG	WFGWARKD	GRQLVYARLLQDE	RATRP	NAGLRARDEL	V	RDWP	M	AGAWRP
OXA-114b	-----								Q					
OXA-114c	-----	D	V											K
OXA-114d	-----								Q					
OXA-114e	-----		V						Q					
OXA-114f	-----		V											
OXA-114g	-----	D	V						Q					
OXA-114h	-----		V											
OXA-114i	-----	D	V						Q					
OXA-114j	-----		V	F										
OXA-114k	-----	D	V						Q					
OXA-114l	-----	D												
OXA-114m	-----	D	V											
OXA-114n	-----		V	F										
OXA-114p	-----	D	V				D							
OXA-114q	-----		V											K
OXA-114r	-----													
OXA-114s	-----	D	V						S					
OXA-114t	-----	D	V											
OXA-114u	-----	D	V				G		H			M		
OXA-114v	-----								Q					

Annexe 4 : Alignement des séquences protéiques des différents variants de l'enzyme OXA-114 suite et fin (3/3)

- : résidu identique à la séquence de référence. Les nombres indiquent la position des résidus selon la nomenclature des β -lactamases de classe D (Couture *et al.* 1992). Les séquences conservées chez les autres oxacillinasés sont surlignées (Sanschagrin *et al.* 1995).

OXA-243a	MTVRLSS TALGAALSLSALAGAPAQAAVLCTV VADAADGRIVYQQGTQQACAARYTPAST	60
OXA-243b	-----	60
OXA-243c	-----M-----	60
OXA-243d	---F---I---	60
OXA-243e	---C-----	60
OXA-243a	FKLPIALMGADAGILTGPHAPVWNYQPGYPDWGGDAWRQPTDPARWIKYSVVWYSQLTAR	120
OXA-243b	-----	120
OXA-243c	-----	120
OXA-243d	-----	120
OXA-243e	-----D-----	120
OXA-243a	ALGQERFQRYASAFHYGNEDVSGE PGKHNGLDGAWINSSLRISPLEQLAFLRKLVNRQLP	180
OXA-243b	-----	180
OXA-243c	-----	180
OXA-243d	-----	180
OXA-243e	-----	180
OXA-243a	LKAAAYDLAENLFEVGEAGGWHLYGKTGTGSPGSNGVYTAANAYGWFVGWARKDGRQLVF	240
OXA-243b	V-----	240
OXA-243c	V-----RMH-----	240
OXA-243d	V-----RMH-----	240
OXA-243e	-----S-RMH-----	240
OXA-243a	ARLVQDEQATKPNAGLRARDDLMRDWPAMADAPRK-	275
OXA-243b	-----	275
OXA-243c	-----	275
OXA-243d	-----	275
OXA-243e	-----A-----	275

Annexe 5 : Alignement des séquences protéiques des différents variants de l'enzyme OXA-243. - : résidu identique à la séquence de référence. Les nombres indiquent la position des résidus selon la nomenclature des β -lactamases de classe D (Couture *et al.* 1992). Les séquences conservées chez les autres oxacillinases sont surlignées (Sanschagrin *et al.* 1995).

Annexe 6 : Sites et nombre de prélèvements d'environnement extérieur

<i>Type</i>	<i>Nom, situation</i>	<i>No. de prélèvements réalisés</i>
Rivière 1 (95 km)	Ouche	11 (eau) 13 (boue)
Rivière 2 (83 km)	Tille	3 (eau) 3 (boue)
Rivière 3 (96 km)	Grosne	1 (eau) 1 (boue)
Rivière 4 (10 km)	Corne	1 (eau) 1 (boue)
Rivière 5 (480 km)	Saône	2 (eau) 1 (boue)
Rivière 6 (214 km)	Ognon	1 (eau)
Ruisseau 1	Nacey	1 (eau)
Lac 1 (37 ha)	Lac Kir, Dijon	4 (eau) 1 (boue) 2 (sol) 1 (plante)
Lac 2 (11,5 ha)	Lac de Genlis	1 (eau) 1 (boue)
Lac 3 (36 ha)	Lac d'Arc sur Tille	2 (eau) 2 (boue)
Lac 4 (7,5 ha)	Lac de la Tille	1 (eau) 1 (boue)
Port de plaisance (3 ha)	Port du Canal Dijon	1 (eau) 1 (boue)
Etang 1	Bibracte	1 (boue)
Etang 2	Lamblin	1 (eau)
Etang 3	Fontaine les Dijon	1 (eau) 1 (boue)
Etang 4	Ecuisses	1 (eau)
Etang 5 (128 ha)	Montaubry	1 (eau)
Etang 6	Bondilly	1 (eau) 1 (boue)
Pré 1	Bibracte	2 (sol)
Pré 2	La charmée	2 (plante)
Vigne	Vosne Romanee	1 (sol) 3 (plante)
Parc 1	Parc de la Colombière, Dijon	4 (plante) 1 (sol)
Parc 2	Longvic	1 (plante)
Potager	Soissons sur Nacey	6 (plante)
Potager	Domois	2 (sols) 3 (plante)
Jardin 1	Fontaine les Dijon	1 (eau)
Jardin 2	Dijon	1 (eau)
Fossé	St Nicolas les Cîteaux	1 (boue)
TOTAL		93

Annexe 7 : Origine des souches des patients non atteints de mucoviscidose

<i>Patient</i>	<i>Date prélèvement</i>	<i>Service</i>	<i>Origine</i>	<i>Résultats ECP</i>
NCF1	04/04/2013	Pneumologie HC	Pulmonaire	Un.
NCF2	06/03/2010	Pneumologie SI	Pulmonaire	Un.
NCF3	16/03/2012	Pneumologie HC	Pulmonaire	Un.
NCF4	17/03/2012	Pneumologie HC	Pulmonaire	I
NCF5	02/04/2012	Pneumologie HC	Pulmonaire	I
NCF6	07/08/2012	Pneumologie HC	Pulmonaire	Un.
NCF7	27/06/2011	Pneumologie SI	Pulmonaire	Un.
NCF8	14/01/2011	Pneumologie SI	Pulmonaire	Un.
NCF9	12/08/2011	Pneumologie SI	Gorge	Un.
NCF10	26/02/2010	Pneumo appareillage	Pulmonaire	Un.
NCF11	04/03/2010	Pneumologie HC	Pulmonaire	Un.
NCF12	04/06/2010	Pneumologie SI	Pulmonaire	Un.
NCF13	11/08/2010	Pneumologie SI	Pulmonaire	C
NCF14	14/03/2012	Réa Ped	Pulmonaire	Un.
NCF15	02/05/2013	Réa Ped	Pulmonaire	L
NCF16	07/03/2013	Hématologie	Hémoculture	Un.
NCF17	18/03/2013	Hématologie	Gorge	Un.
NCF18	11/08/2010	Réa med	Pulmonaire	C
NCF19	19/10/2009	Réa Chir	Pulmonaire	Un.
NCF20	15/10/2009	Réa Chir	Pulmonaire	Un.
NCF21	22/10/2010	Réa Chir	Os (tibia)	Un.
NCF22	28/01/2013	Réa NT	Pulmonaire	I
NCF23	21/06/2011	Réa NT	Pulmonaire	L
NCF24	05/02/2012	Réa Med	Pulmonaire	Un.
NCF25	08/11/2011	Réa Med	Pulmonaire	A
NCF26	9/12/2011	Pneumo appareillage	Pulmonaire	Un.
NCF27	02/07/2011	Réa NT	Pulmonaire	Un.
NCF28	03/10/2010	Réa Med	Pulmonaire	Un.
NCF29	12/11/2012	Hématologie	Hémoculture	I
NCF30	04/09/2009	Pédiatrie	Œil	Un.
NCF31	25/05/2012	Pneumologie	Pulmonaire	Un.
NCF32	29/10/2009	Pédiatrie	Pulmonaire	Un.

HC : Hospitalisation complète ; SI : soins intensifs ; Réa : Réanimation ; Med = Médicale ;
 NT = Neuro-Traumatologique ; Ped = pédiatrique ; Chir = chirurgicale ; Pneumo =
 pneumologie

Annexe 8 : Origines et caractéristiques des 50 souches environnementales (deuxième étude).

N° de souche	Service clinique	Date prélèvement	Origine	Résistances	ECP	Variant OXA
1	Odontologie	30/06/2010	eau du fauteuil, poste 6	CIP	J	114r
2	Odontologie	03/10/2011	eau du fauteuil, poste 7	CIP	J	114r
3	Odontologie	10/02/2010	eau du fauteuil, poste B	CIP	J	114r
4	Odontologie	12/07/2012	eau du fauteuil, poste 10	CIP	J	114r
5	Réa Med (ICU-1)	07/09/2011	ch 445 auge	CIP, IPM	A	114h
	Réa Med (ICU-1)	20/10/2011	ch 445 auge	CIP, IPM	A	114h
	Réa Med (ICU-1)	15/02/2012	ch 445 auge	CIP, IPM	A	114h
6	Réa NT (ICU-2)	05/10/2011	ch 65 auge	CIP	Un.	114i
7	Pédiatrie CRCM	20/10/2011	dévidoir	CIP	E	114f
	Pédiatrie CRCM	17/07/2012	dévidoir	CIP	E	114f
8	Pédiatrie HJ	20/03/2012	consultations, lavabo	CIP	C	114f
9	Pédiatrie HJ	20/03/2012	office lavabo	CIP	D	114h
10	Réa Ped	20/03/2012	entrée du service, auge	CIP	D	114h
11	Néphro SI (ICU-3)	18/11/2011	dévidoir	CIP	B	114p
12	Néphro SI (ICU-3)	18/11/2011	salle de soins auge	CIP	B	114p
13	Néphro HC	18/11/2011	dévidoir 1	CIP	F	114m

N° de souche	Service clinique	Date prélèvement	Origine	Résistances	ECP	Variant OXA
14	Néphro HC	06/12/2011	ch 410 douche	CIP	F	114m
15	Néphro HC	06/12/2011	dévidoir 2	CIP	F	114m
16	Pneumo appareillage	20/12/2011	ch 470 lavabo	CIP	Un.	114g
17	Pneumo appareillage	20/12/2011	ch 471 douche	CIP	Un.	114e
18	Pneumo HC	20/01/2012	salle de soins auge	CIP	Un.	114s
19	Pneumo HC	20/01/2012	ch 690 douche	CIP	G	114h
20	Pneumo HC	21/03/2012	ch 700 douche	CIP, IPM	Un.	114s
21	Pneumo HC	21/03/2012	ch 680 douche	CIP, IPM, DOR	H	114a
22	Pneumo HC	21/03/2012	ch 680 douche	CIP, IPM, DOR	H	114a
23	Hémato HJ	11/07/2012	salle de soins, lavabo	CIP	C	114f
24	Hémato SC	24/07/2012	ch 4 douche	CIP	Un.	114l
25	Hémato SC	25/07/2012	ch 44 lavabo	CIP, IPM	Un.	114g
26	Hémato SC	05/12/2012	ch 32 douche	CIP	C	114f
27	Hémato SC	05/12/2012	ch 32 auge	CIP	C	114f
28	Hémato SC	05/12/2012	ch 32 lavabo	CIP	C	114f
29	Hémato SC	05/12/2012	ch 32 lavabo-2	CIP, IPM, CAZ	C	114f
30	Hémato SC	05/12/2012	ch 34 lavabo	CIP, IPM, CAZ	Un.	114g

N° de souche	Service clinique	Date prélèvement	Origine	Résistances	ECP	Variant OXA
31	Hémato SC	05/12/2012	ch 34 auge	CIP, IPM	I	114c
32	Hémato SC	05/12/2012	ch 36 douche	CIP, IPM	I	114c
33	Hémato SC	05/12/2012	ch 40 auge	CIP, IPM	Un.	243e
34	Ouche (Bligny)	12/04/2012	eau	CIP, IPM	Un.	114g
37	Ouche (Bligny)	12/04/2012	boue	CIP, IPM	Un.	114h
35	Port de Pont d'Ouche	12/04/2012	eau	CIP, IPM, DOR	Un.	114g
36	Ouche (Malain)	12/04/2012	eau	CIP	Un.	114b
38	Ouche (Malain)	12/04/2012	boue	CIP	Un.	114q
39	Saône (Auxonne)	09/07/2012	eau	CIP	D	114h
40	Lac Arc Sur Tille	31/05/2012	eau	CIP	Un.	114u
41	Port du canal Dijon	22/10/2012	eau	CIP, IPM, DOR	Un.	114a
42	Domicile Dijon-1	29/10/2012	évier	CIP	Un.	114t
43	Domicile Dijon-1	29/10/2012	baaignoire	CIP	Un.	114j
44	Domicile Dijon-2	29/10/2012	lavabo	CIP	K (AXX2)	114h
45	Domicile Dijon-3	12/11/2012	baaignoire	CIP	Un.	114c
46	Domicile Dijon-3	12/11/2012	baaignoire	CIP	Un.	114v
47	Domicile Dijon-4	19/11/2012	douche	CIP	Un.	114c

N° de souche	Service clinique	Date prélèvement	Origine	Résistances	ECP	Variant OXA
48	Domicile Dijon-5	19/11/2012	douche	CIP, IPM, DOR	Un.	114a
49	Domicile Dijon-6	30/01/2012	évier	CIP	Un.	114f
50	Domicile Fontaine-Les-Dijons	19/11/2012	baignoire	CIP	Un.	114i

Néphro : Néphrologie ; SI : Soins Intensifs

ICU = Intensive Care Unit (service de réanimation ou soins intensifs)

Pneumo : Pneumologie ; HC : Hospitalisation complète

Hémato : Hématologie ; SC : Surveillance Continue ; HJ : Hospitalisation de Jour

Réa : Réanimation ; Med = Médicale ; NT = Neuro-Traumatologique ; Ped = pédiatrique

CRCM = Centre de Ressources et de Compétences de la mucoviscidose

Ch =chambre

CIP =ciprofloxacine ; CAZ = ceftazidime ; IPM = imipénème ; DOR = doripénème

ECP = Electrophorèse en Champ Pulsé : Un. = pulsotype unique ; les lettres ont été attribuées aux pulsotypes identifiés dans plusieurs souches

Correspondances entre les pulsotypes des souches environnementales et les souches des patients atteints de mucoviscidose :

Pulsotype G = AXX3 ; Pulsotype K = AXX2 ; Pulsotype I = AXX53

Les nouveaux variants d'oxacillinases identifiés dans cette étude figurent en rouge.

3rd ASM (American Society for Microbiology) Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and the Environment, Aix en Provence, 2012. Poster 103C.



Achromobacter xylosoxidans is a Gram negative, aerobic and oxidase positive bacillus, often misidentified as *Pseudomonas aeruginosa*. It is an emerging pathogen in cystic fibrosis patients (sputum samples) and is also sometimes responsible for infections in immunocompromised patients. This species is innately resistant to aminoglycosides, aztreonam and ceftaxime. Acquired resistance to carbapenem, ceftazidime and ciprofloxacin is frequent. During the last years we have observed an increase in the isolation of *A. xylosoxidans* in our Hospital (pulmonary infection, wound infection), mainly in Intensive Care Units and Hematology ward.

Samples from 9 wards
Surfaces, shower wastes,
wash-hand basin, water

- ✓ to search for *A. xylosoxidans* in hospital environment
- ✓ to design a selective medium for *A. xylosoxidans*
- ✓ to determine the antimicrobial susceptibility of the isolates
- ✓ to perform genotypic analysis of the isolates

Selective media
Mc Conkey+xylose+aztreonam
(20 mg/l)+vancomycine (20 mg/l)

Identification
 Api20NE, Maldi-TOF (Bruker)

Antibiotic susceptibility analysis
Disc diffusion method
Detection of integrons

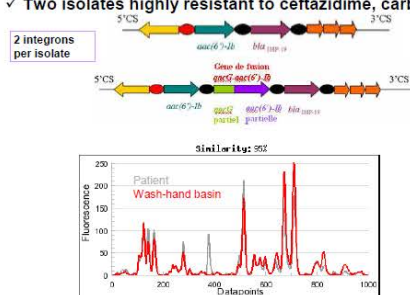
Genotyping
Pulsed-field gel electrophoresis (*Xba*I)
Rep-PCR (Diversilab bioMerieux, France)

- ✓ 25 isolates of *A. xylosoxidans* in the 9 wards (wash-hand basins++)
- ✓ Diversilab as discriminant as PFGE for typing of *A. xylosoxidans*.
- ✓ Genetic diversity of the isolates within the hospital (20 different patterns)
- ✓ Some environmental isolates genetically linked to clinical isolates
- ✓ 23 isolates resistant to ciprofloxacin
- ✓ Two isolates highly resistant to ceftazidime, carbapenems (IMP-19)

Pink colonies :
A. xylooxidans
Pseudomonas sp. resistant to aztreonam



A. xylosoxidans *S. maltophilia*



Department	Number of isolates	Genotyping (assigned pattern number))
Odontology Unit	2	1
ICU (1)	1	2 (linked to a patient's isolate)
ICU (2)	1	3
ICU (3)	1	4
Nephrology	6	5, 6, 7
Hematology	4	8, 9, 10 (10 is linked to patients isolates (outbreak))
Pneumology	6	11, 12, 13, 14, 15, 16
Pediatrics unit	3	17, 18, 19
OncoPed Unit	1	20

ICU: Intensive Care unit

- Thanks to our selective medium, we have detected isolates of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital environment,
- This reservoir, mainly in moist environment, might be a source of patient contamination: direct (splash back, aerosol) or indirect (hands healthcare workers).
- Some isolates are resistant to all available antibiotics. In these isolates beta-lactam resistance is due to metallo-enzyme production (IMP-19). Therefore *A. xylosoxidans* might be a reservoir of such emerging resistance genes for other pathogens like *P. aeruginosa*.

Annexe 9 (suite) : Résumé de la communication :

Achromobacter xylosoxidans is an important emerging pathogen in Cystic Fibrosis patients.

It is also increasingly isolated in different samples from patients in Intensive Care Units (wounds and lungs especially) in our University Hospital (Dijon, France).

This species is innately resistant to aminoglycosides, aztreonam and cefotaxime. Acquired resistance to ceftazidime and carbapenems is frequent, some clinical isolates being resistant to all available antibiotics. The aim of this study was to search for the presence of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital environment (surfaces, toilets, shower wastes, wash-hand basin) in different departments (ICUs, Hematology, Pediatric outpatients, Pneumology Department and Nephrology). For this purpose we have developed a selective medium. Genotypic analysis of environmental isolates has been performed by PFGE and compared with clinical isolates. Antibigrams have been performed by disk-diffusion method.

Results: We have isolated 25 strains of *Achromobacter xylosoxidans*, mostly in wash-hand basins and shower wastes. Environmental isolates from different departments were genotypically different. In a few cases we found environmental isolates with a profile identical to the profile of clinical isolates. This might suggest a patient contamination by environmental *Achromobacter xylosoxidans* through medical procedures. The environmental isolates were mainly susceptible to ceftazidime and carbapenems, with the exception of two isolates highly resistant to ceftazidime and imipenem which produced the metallo beta-lactamase IMP-19.

Conclusion: We have detected some reservoirs of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital environment. The selective medium which we have developed improves the detection of the isolates. *Achromobacter xylosoxidans* is mostly resistant to quaternary ammonium compounds present in many products used for hospital disinfection procedures. In some cases the use of bleaching water should be recommended.

Annexe 10 : Résumé des articles décrivant les systèmes d'efflux AxyABM et AxyXY-OprZ

A. xylosoxidans est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques : aminosides, aztréonam, céphalosporines, quinolones. La présence de systèmes d'efflux de type RND, fréquente chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires, pourrait expliquer en partie le phénotype, mais n'avait jamais été explorée avant le début de nos travaux. Les deux articles suivants présentent les systèmes d'efflux caractérisés au laboratoire.

Bador J., Amoureux L., Duez J. M., Drabowicz A., Siebor E., Llanes C. and Neuwirth C. (2011). "First description of an RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM." *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 4912-4.

Dans cette première étude, la recherche de systèmes d'efflux de type RND par PCR consensus a permis de détecter 3 gènes candidats dans une souche clinique d'*A. xylosoxidans* (AXX-A) présentant un phénotype sauvage. Ces 3 gènes, organisés en opéron (*axyABM*), codent pour une protéine de fusion membranaire (AxyA), une pompe d'efflux (AxyB) et une protéine de membrane externe (AxyM). Les 3 constituants de ce système présentent une forte homologie de séquence avec des protéines d'efflux RND dont le système MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa*. Dans un premier temps, afin d'observer l'éventuelle implication d'AxyABM dans la résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* aux antibiotiques, le gène *axyB* a été inactivé par le biais d'un plasmide suicide dans la souche AXX-A ainsi que dans 3 autres souches présentant des résistances acquises (notamment à la ceftazidime, à la ciprofloxacine et aux carbapénèmes).

Dans les souches dans lesquelles le gène *axyB* a été inactivé, les concentrations minimales inhibitrices de plusieurs antibiotiques ont diminué. Les principales conclusions de cette étude sont les suivantes :

- **AxyABM est le principal mécanisme en cause dans la résistance intrinsèque d'*A. xylosoxidans* à l'aztréonam et au céfotaxime.**
- l'acide nalidixique, les fluoroquinolones, la ceftazidime et le chloramphénicol font aussi partie des substrats d'AxyABM.
- AxyABM pourrait jouer un rôle dans l'acquisition de la résistance aux carbapénèmes (hors imipénème).

Il est intéressant de noter qu'AxyABM et MexAB-OprM (de *P. aeruginosa*) ont des profils de substrats très similaires.

Bador J., Amoureux L., Blanc E. and Neuwirth C. (2013). "Innate Aminoglycoside Resistance of *Achromobacter xylosoxidans* is due to AxyXY-OprZ, an RND-Type Multidrug Efflux Pump." *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 603-5.

Cette seconde étude décrit un second système d'efflux de type RND : AxyXY-OprZ. Le repérage *in silico* dans le génome d'AXX-A a permis la détection de l'opéron codant pour le système AxyXY-OprZ auquel nous nous sommes intéressés en raison de son homologie avec MexXY-OprZ, système impliqué dans la résistance acquise de *P. aeruginosa* aux aminosides. Dans ce travail, le gène *axyY*, codant pour le transporteur a été inactivé par la même technique que dans la première étude dans la souche sauvage AXX-A ainsi que dans 2 souches cliniques présentant des résistances acquises à la ceftazidime et aux carbapénèmes.

Le résultat le plus marquant de ces expériences d'inactivation génique est la restauration de l'activité de tous les aminosides utilisés en thérapeutique (la tobramycine, l'amikacine, la gentamicine et la nétilmicine) sur les 3 souches étudiées.

AxyXY-OprZ est donc responsable de la résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* aux aminosides.

L'inactivation d'*axyY* entraîne également des diminutions de CMI de tous les carbapénèmes, ainsi que de la ceftazidime, du céfépime, de l'acide nalidixique, des cyclines, de l'érythromycine et des fluoroquinolones.

Le panel de substrats antibiotiques d'AxyXY-OprZ est donc très similaire à celui de MexXY/OprM de *P. aeruginosa*.